



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Husdjursgenetik

Karakterisering av genetiska riskfaktorer för dilaterad kardiomyopati hos hund

Sofia Jankulovska

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:35*

Karakterisering av genetiska riskfaktorer för dilaterad kardiomyopati hos hund

Characterization of genetic risk factors for canine dilated cardiomyopathy

Sofia Jankulovska

Handledare: Göran Andersson, institutionen för husdjursgenetik, HGEN

Biträdande handledare: Åsa Ohlsson Andersson, institutionen för husdjursgenetik, HGEN

Biträdande handledare: Ingrid Ljungvall, institutionen för kliniska vetenskaper, KV

Examinator: Gabriella Lindgren, institutionen för husdjursgenetik, HGEN

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0752

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serietitel, nr: Examensarbete 2017:35

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Dilaterad kardiomyopati, hund, grand danois, newfoundlandshundar, genetisk associationsstudie, next-generation sequencing, digitalPCR, genetiska riskfaktorer

Keywords: Dilated cardiomyopathy, canine, Grand danois, Newfoundlands dogs, genome-wide association studies, next-generation sequencing, digitalPCR, genetic risk factors

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

SAMMANFATTNING

Dilaterad kardiomyopati (DCM), är en hjärtsjukdom som förekommer hos ett flertal hundraser. Etiologin är inte fastställd. Genetiska studier på hund visar att gener involverade i utvecklandet av DCM skiljer sig åt mellan olika hundraser. Idag har gener involverade i den genetiska utvecklingen av DCM identifierats hos raserna boxer, dobermann pinscher och irländsk varghund. Nedärvningsmönstret för DCM hos grand danois och newfoundlandshundar, som studerats i detta projekt, överensstämmer med en komplex eller polygen nedärvning. Om en gen identifieras ge upphov till DCM kan genens upp- eller nedreglering påverka andra omkringliggande gener som i sin tur påverkar hjärtats funktion.

Tidigare utförda genetiska associationsstudier (GWAS) i projektet har identifierat en associerad 1,5 Mb region på kromosom 19 hos grand danois. Regionen uppvisar ett ökat kopietal hos DCM diagnosticerade hundar, så kallat kopietalsvariation (copy number variation, CNV). Dessa CNV-regioner kallas även för ”gene deserts”, då de saknar gener och ofta har genreglerande aktivitet. Den mest sannolika tolkningen varför fler kopior av en sådan region kan vara associerad med ökad risk att utveckla DCM är att den innehåller sekvenser som påverkar genuttryck av gener som ligger i nära anslutning till regionen, men kan även påverka andra gener som ligger på längre avstånd. Hos newfoundlandshundar har GWAS utförts tidigare i projektet. I den rasen, har endast några kandidatregioner identifierats vara associerade till ökad risk att utveckla DCM. Därför behövs fler hundar genotypas för att få säkrare associationsresultat. En möjlighet är att genotypa DNA preparerat från en uppsättning histopatologiskt hjärtvävnadsmaterial från sjuka och friska newfoundlandshundar.

Det första syftet i projektet undersökning av gener i närhet till ”gene-desert” regionen och gener med känd funktion i hjärtmuskulatur, för att se om det förekommer differentiellt genuttryck hos grand danois. De gener som undersökts är; *CFC1B* som ligger uppströms om ”gene-desert” regionen och *AMER3* som ligger nedströms. *MYH7* och *TNNT2*, två gener som ofta är förknippade med DCM. *TRDN*, en gen som visats vara nedreglerad i tidigare DCM studie hos grand danois. Tre olika ”housekeeping gener” har också undersökts; *GAPDH*; en generell referensgen som använts vid flera studier och i olika vävnader, *B2M*; använd referensgen och har tidigare använts vid studier av frisk hjärtvävnad hos hund och *SRP14*; använd tidigare på såväl frisk som sjuk hjärtvävnad hos människa. Det andra syftet i projektet, var att utföra en molekyलगenetisk analys av genomiskt DNA preparerat från formalinfixerade, paraffin-inbäddade hjärtvävnadsklossar och med hjälp av PCR definiera om DNA kvaliteten av histopatologiskt DNA var av tillräckligt god kvalitet för validering av tidigare uppnådda GWAS resultat utförda hos newfoundlandshundar.

Resultaten i projektet kunde inte påvisa förändrat genuttryck i hjärtvävnad från DCM diagnosticerade grand danois för de undersökta generna. Vidare forskning krävs för definiering om ”gene desert” regionens effekt på uttrycksnivåerna av de undersökta generna. Stabila nivåer kunde etableras för ”housekeeping genen” *B2M* i hjärtvävnad hos grand danois. I det andra delprojektet, rörande kvalitetsbedömning av genomiskt DNA preparerat från histopatologiska hjärtvävnadsprover från newfoundlandshundar visade att undersökt genomiskt DNA var degraderat. Vidare undersökning krävs för validering om DNA kvaliteten är tillräckligt god för vidare genotypningsanalys.

SUMMARY

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a heart disease which occurs in several breeds. The aetiology has not been established. Genetic studies in canines indicate that genes involved in the development of DCM differ between different canine breeds. Today, genes involved in the genetic development of DCM are identified in Boxer, Doberman pinscher and the Irish Wolfhounds. The inheritance-pattern of DCM in Great Danes and Newfoundland dogs were studied in this project. The pattern is consistent with a complex or polygenic inheritance. If a gene is identified to be the basis for the development of DCM; gene up- or down-regulation may affect other surrounding genes, which in turn may affect the heart's function.

Previously performed genetic association studies (GWAS) in the project have identified an associated 1.5 Mb region on chromosome 19 in Great Danes. The region has an increased copy number in DCM diagnosed canines, called copy number variation (CNV). These CNV-regions are also called "gene deserts" because of the absence of genes and their gene regulatory activity. The most likely interpretation why more copies of a region may be associated with increased risk of developing DCM is containing sequences that influence gene expression of genes located in close proximity to the region, but can also affect other genes located further away. GWAS has also been conducted earlier in the project for Newfoundland dogs. In this breed there have only been a few candidate regions identified, to be associated with increased risk of developing DCM, hence the need for more canines, to be genotyped, to receive safer association results. One possibility is to genotype DNA prepared from a set of histopathological cardiac tissue material from sick and healthy Newfoundland dogs.

The first aim of this project is to examine in Great Danes different genes in proximity to the "gene-desert" region, and genes that are known for their function in the heart muscle, to see if there is differential gene expression. Genes that have been studied are; *CFC1B* located upstream of "gene-desert" region and *AMER3* located downstream, *MYH7* and *TNNT2*, two genes that tend to be associated with DCM, *TRDN*, a gene shown to be down regulated in previous DCM study in Great Danes. Three different "housekeeping genes" have also been examined; *GAPDH*; a general reference gene and used in several tissues, *B2M*; often used as reference gene and been studied in healthy heart tissue in canines, *SRP14*; used in both healthy and diseased heart tissue in humans. The second objective of this project was to perform a molecular genetic analysis of genomic DNA prepared from formalin fixed paraffin embedded-heart tissue blocks and using PCR to redefine if the DNA quality of these histopathological DNA was of sufficient quality to validate previously achieved GWAS results performed in Newfoundland dogs.

The results in this project could not detect altered gene expression in heart tissue taken from DCM diagnosed Great Danes for the investigated genes. Further research is required to define whether the "gene desert" region has effect on the expression levels of the examined genes. Stable levels of the "housekeeping gene" *B2M* in heart tissue of Great Danes was established. In the second study, regarding the quality of the genomic DNA prepared from histopathological heart tissue samples from Newfoundland dogs showed that the genomic DNA was degraded and further investigation is required to see if the DNA quality is good enough for further genotyping assays.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	3
Hjärtats anatomi och fysiologi.....	3
Hjärtsjukdomar	4
Dilaterad kardiomyopati (DCM).....	4
Prevalens	4
Etiologi	5
Patofysiologi.....	5
Sjukdomsförlopp	6
Kliniska sjukdomstecken.....	6
Diagnostik	7
Patologi.....	7
Behandling	7
Prognos.....	8
Avel.....	8
Genetik.....	8
Polymerase Chain Reaction (PCR)	8
Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	9
Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	9
Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)	9
Genetisk associationsstudie (GWAS)	9
Next-Generation Sequencing (NGS)	11
Tidigare genetisk forskning utförd hos hundar diagnosticerade med DCM.....	12
”Housekeeping gener”	12
Kandidatgener av relevans att undersöka hos grand danois diagnosticerade med DCM	13
MATERIAL OCH METODER	14
Etisk prövning.....	14
Hundar och vävnadsselektion	14
Molekylärgenetiska metoder	14
DNA och RNA extraktion.....	15
DNA och RNA isolering samt kvalitetskontroll	15
cDNA syntes	16
Amplifiering och verifiering av DNA.....	16
ddPCR preparering och avläsning.....	17
Primerdesign och kontroll	19
Analys av ”housekeeping gener”	19
Statistisk analys av data på respektive gen	19

RESULTAT	20
Grand danois hundar	20
Utvärdering av RNA-kvalitet	20
Genuttryck med hjälp av ddPCR	21
”Housekeeping gener”	21
Utvärdering av DCM-relaterade gener	22
Newfoundlandshundar	24
DNA-preparation från formalinfixerad och paraffininbäddad (FFPE)-vävnad	24
Potentiella problem vid genetiska studier	25
Felkälla vid avläsning i QuantaSoft	25
Felkälla vid kontroll av band med HotStarTaq-kit	26
DISKUSSION	27
KONKLUSION	31
REFERENSER	32
Litteratur och publikationer	32
Tack	37

INLEDNING

Dilaterad kardiomyopati, DCM är en hjärtsjukdom som framför allt förekommer hos medelstora, stora och "giant" hundraser (Tidholm et al., 2001; O'Grady & O'Sullivan, 2004; Wess, 2014). Vissa raser är predisponerade till att utveckla DCM, så som boxer (Meurs et al., 1999), dobermann pinscher (Calvert & Brown, 2004), grand danois (Meurs et al., 2001; Bogarelli et al., 2006; Martin et al., 2009; Stephenson et al., 2012), irländsk varghund (Brownlie & Cobb, 1999; Vollmar, 2000) och newfoundlandshund (Tidholm & Jonsson, 1996; Wiersma et al., 2007; Philipp et al., 2007) med flera. Sjukdomen karakteriseras av att hjärtat blir förstorat på grund av en försvagad hjärtmuskel och en minskad kontraktionskraft (Mestroni et al., 1999). Vid utveckling av sjukdomen minskas hjärtats förmåga att distribuera ut blod, vilket ansamlas framför allt i vener, men även i hjärtat. DCM är förknippat med en dålig prognos, då sjukdomen inte kan botas utan endast behandlas i syfte att minska kliniska sjukdomstecken hos drabbade hundar. De flesta hundar med denna sjukdom kommer med tiden att utveckla tecken på kongestiv hjärtsvikt, medan enstaka hundar kan dö i plötslig hjärtdöd till följd av arytmier innan övriga sjukdomstecken har hunnit utvecklas (Mestroni et al., 1999; Seidman & Seidman, 2001; Wiersma et al., 2007; Philipp et al. 2012; Wess, 2014).

Det faktum att DCM förekommer mer frekvent hos vissa hundraser visar att risken att utveckla sjukdomen kan ha en ärftlig komponent (Wess, 2014). Pågående forskning vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) syftar att ta reda på vilka genetiska riskfaktorer i arvsmassan som är associerade med ökad risk att utveckla sjukdomen. Denna kunskap kan förhoppningsvis i framtiden nyttjas vid diagnosticering av DCM och även bidra till en ökad förståelse av de patofysiologiska förändringarna som sker hos drabbade individer (Simpson et al., 2015). Kunskapen om genetiska riskfaktorer kan också användas för att utveckla genetiska tester som kan ingå i olika avelsprogram hos drabbade hundraser för att minska förekomsten av sjukdomen inom respektive ras.

Tidigare resultat som erhållits inom projektet "identifiering av gener som predisponerar för dilaterad kardiomyopati hos hund och människa", vars fokus är att identifiera och validera DCM-framkallade mutationer hos både hund och människa, har regioner i arvsmassan identifierats vara associerade med ökad risk att utveckla DCM hos grand danois hundar och newfoundlandshundar. Resultaten har erhållits genom att genetiska associationsstudier (GWAS), har utförts i dessa båda hundraser. En region i genomet, en så kallad "gene desert"-region, det vill säga en del i genomet som saknar gener som troligen är kopplad till sjukdomen, har med GWAS lokaliserats hos grand danois hundar. Uppföljande sekvensering av regionen från både sjuka och friska hundar visade att regionen uppvisade så kallade ökat kopietal hos de sjuka grand danois hundarna. Denna typ av regioner kan innehålla regulatoriska DNA sekvenser som påverkar hur genuttryck regleras, vilket i sin tur beroende på vilka gener som är påverkade kan ge olika skador i hjärtat. En bioinformatisk analys av regionen har utförts och vissa delar uppvisar hög sekvenslikhet mellan arter samt att de har hög regulatorisk potential indikerar att dessa regioner kan påverka genuttryck (opublicerade resultat). På så sätt skulle ett ökat kopietal av denna region kunna vara en påverkande genetisk faktor för genuttryck (Brown, 2007). Om ett förändrat genuttryck hos de undersökta generna hos grand danois hittas skulle ett sådant fynd vara en stark indikation på att "gene-desert" hos

grand danois hundar innehöll sådana regulatoriska sekvenser som styr uttryck i hjärtvävnad av gener i dess närhet eller gener som ligger längre ifrån. Det skulle även indikera att det förändrade kopietalet leder till en ökad genetisk risk att utveckla DCM.

Syftet med examensarbetet var att undersöka om det förekommer differentiellt genuttryck i hjärtmuskelvävnad för gener kopplade till utvecklingen av DCM hos hundrasen grand danois samt att utföra en molekylärgenetisk analys av genomiskt DNA med hjälp av PCR för att definiera om DNA kvaliteten av histopatologiskt DNA var av tillräckligt god kvalitet för validering av tidigare uppnådda GWAS resultat hos newfoundlandshundar. Studier och analyser av differentiellt genuttryck hos grand danois och molekylärgenetisk analys av genomiskt DNA hos newfoundlandshundar har därför genomförts. I projektet undersökte vi därför om genuttryck av några specifika gener som *CFC1B*, *AMER3*, *MYH7*, *TNNT2* och *TRDN* skulle var förändrat i hjärtvävnad från sjuka hundar jämfört med hos friska hundar. Vi analyserade nivåer av mRNA från olika delar av hjärtat (vänster kammare och vänster papillarmuskel) från hundar diagnosticerade med DCM och från friska kontrollhundar. Nivåerna av mRNA har sedan jämförts mellan gener i anslutning till "gene desert" regionen och några övriga generella "DCM gener". Resultaten av jämförelsen av mRNA nivåerna har studeras för att se om det förekom en skillnad mellan hundar diagnosticerade med DCM och friska kontrollhundar. Hos newfoundlandshundar har kvaliteten av genomiskt DNA från histopatologiska hjärtvävnadsprover validerats.

LITTERATURÖVERSIKT

Hjärtats anatomi och fysiologi

Hjärtat är ett viktigt organ som distribuerar syrerikt blod till kroppens olika organ. Till den högra delen av hjärtat kommer syrefattigt blod från kroppen och blodet distribueras sedan till lungorna för att syresättas. Till den vänstra delen av hjärtat kommer syresatt blod från lungorna för att sedan gå vidare ut i kroppen och syresätta kroppens olika celler (Dyce et al., 2010). Hjärtat består av *atrium dextrum* (höger förmak), *ventriculus dexter* (höger kammare), *atrium sinistrum* (vänster förmak) och *ventriculus sinister* (vänster kammare). Dessa fyra delar bygger upp hjärtat tillsammans med artärer, vener och klaffar (Sonesson & Sonesson, 2006; Dyce et al., 2010; Sjaastad et al., 2010). Hjärtat omsluts av perikardiet (hjärtsäcken) som innehåller en liten mängd vätska. Epikardiet (yttersta lagret), myokardiet (mellersta lagret) och endokardiet (inre lagret) bildar tillsammans hjärtväggen. Hjärtväggen är uppbyggd av avlånga myocyter (muskelceller) som består av långa myofibriller (muskelfibrer). Myofibriller består av sarkomerer som är uppbyggt av aktin (tunna filament) och myosin (tjocka filament). Andra associerade proteiner är tropomyosin och troponin. Vid en kontraktion aktiveras myocyterna med hjälp av spänningsberoende Ca^{2+} -kanaler, vilket leder till att myofibrillerna förkortas och att hjärtcellen drar ihop sig. Kontraktionen blir organiserad genom att de flesta myocyter aktiveras samtidigt (Dyce et al., 2010; Sjaastad et al., 2010). En ändring i någon av dessa komponenter eller i anslutande komponenter kan medföra en förändring i hjärtat och dess funktion, vilket kan leda till sjukdom (Olson et al., 1998).

För att hjärtat ska kunna fungera optimalt krävs det att dess olika delar samarbetar på rätt sätt. Detta sker genom koordinerade rytmiska kontraktioner, vilket styrs av hjärtats retledningssystem. Det innebär att små elektriska signaler skickas ut till cellerna i hjärtat. En aktionspotential uppstår när hjärtcellen depolariseras, vilket sker när Ca^{2+} och Na^{+} tas upp av cellen. Cellen blir positivt laddad och när ett tröskelvärde nås sker en depolarisering. Aktionspotentialen i hjärtat börjar i den övre delen av högra förmaket där sinusknutan är placerad, men fördröjs i AV-knutan, vilket säkrar att kamrarna hinner fyllas ordentligt med blod från förmaken. Därefter förs signalerna till Hisska bunt och vidare ut i en höger och en vänster skänkel, och sedan ut i purkinjefibrer för stimulering av kamrarnas kontraktion (Sjaastad et al., 2010; Nelson & Couto, 2014).

Blodets flöde genom hjärtat börjar när syrefattigt blod kommer in i höger förmak via övre- och nedre hålvenen (*vena cava cranialis* respektive *caudalis*). När trycket i höger kammare blir lägre än i höger förmak öppnas segelklaffen med tre klaffblad (*tricuspidalis*), vilket medför att blodet passivt passerar klaffen till höger kammare. För att utnyttja hjärtats volymkapacitet kontraherar förmaket; vilket resulterar i att mer blod forceras in till kammaren. När kammaren börjar kontrahera ökar kammartrycket och segelklaffen stängs. Liknande kontraktioner sker samtidigt på vänster sida, där segelklaffen med två klaffblad (*mitralis/bicuspidalis*) istället är involverad. När trycket i kamrarna överstiger artärtrycket på vänster respektive höger sida öppnas artärernas klaffar och blodet transporteras ut via stora kroppspulsådern (*aorta*) samt lungartären (*arteria pulmonalis*). På så sätt halveras hjärtats blodvolym och kallas även för den systoliska fasen i hjärtcykeln. När kamrarna relaxerar och

trycket sjunker under artärtrycket stängs klaffarna. När kammartrycket sjunkit under artärtrycket öppnas segelklaffarna på höger sida och vänster sida, även kallat den diastoliska fasen, vilket medför att en ny hjärtcykel kan börja (Dyce et al., 2010; Sjaastad et al., 2010; Nelson & Couto, 2014).

Hjärtsjukdomar

Hjärtsjukdomar av olika typer kan drabba både människa och djur (Mestroni et al., 1999; Meurs et al., 2008). De delas in i medfödda/kongenitala hjärtsjukdomar och förvärvade hjärtsjukdomar där hjärtsjukdom utvecklas efter födsel (Nelson & Couto, 2014). Kardiomyopati är ett samlingsnamn för en grupp förvärvade hjärtsjukdomar som drabbar både människor och djur (Watkins et al., 2011). Kardiomyopatier kan delas in i två former beroende på etiologi. Den primära formen är när sjukdom uppstår just primärt i hjärtat, oftast utan fastställd orsak. Den sekundära formen är när sjukdom uppstår till följd av till exempel olika inflammatoriska processer, toxiner, metaboliska rubbningar, förändring i blodcirkulation eller autoimmun sjukdom (McNally et al., 2013). Den primära formen av kardiomyopati, vars benämning har sitt ursprung efter myokardiets påverkan, delas in i 1) hypertrofisk kardiomyopati (HCM) och 2) restriktiv kardiomyopati (RCM); som båda primärt medför nedsatt fyllningsförmåga av vänster kammare under den diastoliska fasen (Watkins et al., 2011), 3) dilaterad kardiomyopati (DCM); som primärt medför nedsatt sammandragningsförmåga av hjärtmuskeln under den systoliska fasen (Dukes-McEwan et al., 2003), 4) arytmogen högerkammarkardiomyopati (ARVC); som ofta resulterar i kammararytmier och plötslig hjärtdöd, (Calvert & Brown, 2004; Meurs, 2004; Summerfield, 2015) och 5) oklassifierad kardiomyopati; som består av fall av kardiomyopatier som inte passar in i de ovan nämnda definitionerna (Nelson & Couto, 2014).

Dilaterad kardiomyopati (DCM)

Prevalens

Dilaterad kardiomyopati (DCM) är den vanligaste typen av kardiomyopati hos större hundraser (Wiersma et al., 2008) och sjukdomen är ofta förknippad till specifika raser, bland annat boxer (Meurs et al., 1999; Philipp et al., 2012), dobermann pinscher (Calvert & Brown, 2004; Philipp et al., 2012), engelsk cockerspaniel (Philipp et al., 2012; Wess, 2014), grand danois (Bogarelli et al., 2006; Martin et al., 2009; Stephenson et al., 2012; Philipp et al., 2012), irländsk varghund (Vollmar, 2000; Philipp et al., 2012), portugisisk vattenhund med flera (Philipp et al., 2012). Det är i huvudsak stora till ”giant” hundraser, men även medelstora hundraser som oftast drabbas av sjukdomen (Tidholm et al., 2001; O’Grady & O’Sullivan, 2004; Wess, 2014). Det finns även en viss predisposition bland hanhundar inom raserna boxer, grand danois och irländsk varghund (Wess, 2014). Förekomsten av DCM har rapporterats vara cirka 10 % hos 54 undersökta svenska hundraser försäkrade hos Agria djurförsäkring (Egenvall et al., 2006). Sjukdomen kan uppträda när som helst i livet och det finns fall beskrivna redan från 1 års ålder. Vanligtvis uppträder dock sjukdomen vid fem till sju års ålder hos drabbade individer (Calvert et al., 1997; Distl et al., 2007; Simpson et al., 2015).

Etiologi

Orsakerna till uppkomsten av DCM är fortfarande till stor del okänd, men hos vissa raser finns en tydlig genetisk riskfaktor beskriven (Cobb, 1992; Mestroni et al., 1999; Hershberger et al., 2009; Simpson et al., 2015). DCM delas in i två former; en primär/idiopatisk form, när sjukdomen uppstår av okänd etiologi (Tidholm, 2000; Werner et al., 2008; Stephenson et al., 2012) och en sekundär form, när sjukdom uppstår som en följd av bland annat inflammatoriska- och metaboliska orsaker (ex. diabetes mellitus, pheochromocytom och hypothyroidism), näringsbrist (ex. carnitin och taurin), takykardi eller som en följd av intag av diverse läkemedel- eller toxiner (Sisson et al., 2000; Tidholm et al., 2001; O'Grady & O'Sullivan, 2004).

En familiär/ärfdig bakgrund för DCM har som indikerats ovan, föreslagits för flera hundraser och även för människor (Jarcho et al., 1989; Watkins et al., 2011). Hos människa är DCM en genetisk heterogen sjukdom (Zhao et al., 2015). Flera humana riskgener har utforskats som kandidatgener för DCM hos hund, men utesluts som orsak till DCM hos bland annat dobermann pinscher, irländsk varghund och newfoundlandshundar (Cobb, 1992; Wiersma et al., 2008; Simpson et al., 2015). Den genetiska riskfaktor som har föreslagits hos boxer är en deletion i den otranslaterade 3'-regionen av striatingenen. Denna riskfaktor har, inom rasen, associerats till DCM i homozygot form. Detta medför att det protein som kodar för desmosomet blir mindre i mängd och en minskning av desmosomalprotein fås i myokardiet (Meurs et al., 2013; Simpson et al., 2015). Hos dobermann pinscher har en association till pyruvatdehydrogenaskinas 4 (*PDK4*) genen på kromosom 14 och ökad risk att utveckla DCM identifierats. Den förändring i genen som setts är en 16 baspar deletion i 5'-regionen av intron 10, vilket skapar ett kryptiskt splice site. PDK4 hjälper till att reglera energimetabolismen i hjärtat via pyruvat dehydrogenaskomplexet (PDH). En ändring medför att PDK4 aktivitet minskar, vilket i sin tur minskar förmågan att hämma glukosoxidationen och fosforyleringen (Meurs et al., 2012; Simpson et al., 2015). Det har även setts en association hos vissa diagnosticerade DCM hundar med en mutation i *ACTN2* och en association på kromosom 5 som förklarar ca 50 % av DCM fallen i Storbritannien och i Tyskland inom rasen dobermann pinscher (Mausberg et al., 2011; Philipp et al., 2012). Flera loci har associerats med utveckling av DCM hos irländsk varghund där arvs gången beskrivits vara en autosomal nedärvning. En enkel-nukleotid polymorfism, en så kallad SNP, på *Canis familiaris* kromosom 37, vid denna SNP har två närliggande gener som kodar för enzymer involverade i lipidmetabolismen föreslagits vara påverkade (Philipp et al., 2012; Simpson et al., 2015).

Patofysiologi

DCM kännetecknas av en myokardiell systolisk och diastolisk dysfunktion, vilket orsakar en minskad kontraktionsförmåga, samt genom kammardilatation av vänster och/eller båda hjärtkamrarna (Philipp et al., 2012). Hjärtats minskade kontraktionsförmåga orsakas av att myocyter och omgivande vävnad (extracellulär matrix) förändras och som följd kan inte längre blodet pumpas ut normalt i kroppen, utan stannar kvar i hjärtat, vilket leder till kammardilatation (Everett et al., 1999; Prosek, 2014). Detta försöker kroppen kompensera genom att öka hjärtminutvolymen med hjälp av sympatikuspåslag; som fås av att juxtaglomerulära apparaten i njuren känner av det minskade blodflödet. En frisättning av renin sker för att aktivera renin-angiotensin-aldosteron-systemet (RAAS), vilket leder till att

hjärtfrekvensen ökar genom att stimulera kontraktion av arterioler och öka reabsorption av Na^+ (Dukes-McEwan, 2000). Stimulering av ett försvagat och uttänjt hjärta kan leda till förmaksflimmer och takyarytmier. Detta i sin tur kan skada hjärtats muskulatur och ge en minskning i hjärtminutvolymen i takt med att hjärtat inte får tillräckligt med syre till sina celler (Jacobs, 1996; Dukes-McEwan, 2000; Rang et al., 2016). Sjukdomstecknen kan fås till följd av lungödem eftersom hjärtats vänstra halva inte förmår att pumpa blodet vidare från lungkärlen till aorta. Trycket stiger i lungkärlen och fri vätska från blodet pressas ut i lungvävnaden (Wess, 2014; Summerfields, 2015). Vid DCM kan även höger sida av hjärtat påverkas, vilket kan leda till stasning av blod bakåt i pumpsystemet, vätskeanhopningar i inre organ (exempelvis levern) och utveckling av ascites (Wess, 2014). Det är vanligt att både vänstra och högra hjärthalvan sviktar (Wess, 2014).

Sjukdomsförlopp

Sjukdomen har beskrivits ha en preklinisk ("occult") och en klinisk ("overt") sjukdomsfas (Dukes-McEwan et al., 2003). Progressionen av sjukdomsförloppet varierar för olika hundraser (Tidholm, 2000). I preklinisk fas av DCM har kliniska sjukdomstecken inte upptäckts, vilket beror på sjukdomens smygande karaktär där hjärtat fortfarande klarar av att kompensera och upprätthålla kroppens krav på blodcirkulation (Wess, 2014; Summerfield, 2015). Den prekliniska fasen kan delas in i två delar; 1) hunden visar inga kliniska sjukdomstecken och hjärtat är morfologiskt och elektriskt normalt vid undersökning med olika diagnostiska hjälpmedel såsom ultraljud och röntgen, 2) hunden visar inga kliniska sjukdomstecken, däremot ses en förändring i hjärtat i form av morfologiska (först och främst vänstersidig förstoring i systole/diastole) och elektriska förändringar (olika typer av arytmier) (O'Grady & O'Sullivan, 2004; Calvert & Brown, 2004). De kliniska sjukdomstecknen uppträder när kroppens förmåga att upprätthålla blodcirkulationen påverkas och patienten utvecklar hjärtsvikt, alternativt att hunden börjar svimma eller bli vinglig på grund av olika arytmiska episoder (Wess, 2014).

Kliniska sjukdomstecken

Vanligt förekommande kliniska sjukdomstecken är bland annat hosta, påverkat andningsmönster och frekvens, oro, ovilja att ligga på sidan och motionsintolerans (Wess, 2014; Summerfields, 2015). Även svimningar och vinglighet kan indikera hjärtpåverkan. Arytmier, exempelvis kammarextraslag och förmaksflimmer, är vanligt förekommande hos hundar som drabbas av sjukdomen (Calvert et al., 1996; Calvert et al., 1997; Brownlie & Cobb, 1999; Tidholm, 2000; Meurs et al., 2001; Dukes-McEwan et al., 2003; Calvert & Brown, 2004; Stephenson et al., 2012; Wess, 2014). Vilka kliniska sjukdomstecken hunden utvecklar beror delvis på vilket stadium av sjukdomsutvecklingen hunden befinner sig i och vilken typ av hundras. Det är inte alltid kliniska sjukdomstecken orsakade av högersidiga hjärtproblem hinner utvecklas om massiva förändringar på vänster sida i hjärtat har hunnit utveckla sig under en längre tid innan sjukdomsprogressionen övergår till högersidan av hjärtat (Nelson & Couto, 2014). Drabbade hundar utvecklar ofta tecken på kongestiv hjärtsvikt under progressionen av sjukdomen (Dukes-McEwan et al., 2003). Då ses ofta kliniska sjukdomstecken såsom dyspné (andnöd), takypné (ökad andningsfrekvens), anorexi (avmagring), viktminskning och polydipsi (ökad törst) (Tidholm & Jonsson, 1996). Takykardi

(ökad hjärtfrekvens) kan leda till kammarflimmer. Både grava takyarytmier och bradyarytmier kan leda till plötslig död (O'Grady & O'Sullivan, 2004; Wess, 2014).

Diagnostik

För diagnosticering av DCM utförs en allmän klinisk undersökning med inriktning på kardiologiska aspekter. Vid klinisk undersökning av hundar med DCM hörs i de flesta fall lindriga till måttliga systoliska blåsljud över mitralisområdet vid hjärtauskultation (Dukes-McEwan et al., 2003). Ibland hörs blåsljudet tillsammans med en galopptrytm (Dukes-McEwan et al., 2003), vilket oftast hos hundar med DCM orsakas av uppkomsten av en tredje hjärnton (S3). Detta sker vid nedsatt förmåga att expandera hos myokardiet under den snabba fyllnadsfasen i tidig diastole (Kvart & Häggström, 2002).

Andra diagnostiska metoder som används är bland annat ultraljud (ekokardiografi), där DCM diagnosticeras genom nedsatt systolisk funktion, kamnardilatation samt förmaksdilatation (Morrison et al., 1992; Tidholm, 2000; Dukes-McEwan et al., 2003). Elektrokardiografi används för detektion av arytmier med hjälp av standard EKG-inspelning och med 24-timmars EKG undersökning (Holterundersökning) (Summerfields, 2015). Vid röntgenundersökning kan tecken på vänstersidig och högersidig hjärtförstoring diagnosticeras. En generell förstoring av hjärtsiluetten på röntgen kan även ses vid förekomst av pleural effusion (vätska i hjärtsäcken) (Tidholm, 2000; Dukes-McEwan et al., 2003). Det är inte alltid diagnosticering av DCM hinner sker, vilket beror på att vissa hundar avlider plötslig. Sjukdomen kan också diagnosticeras vid obduktion (Tidholm, 2000).

Patologi

Patologin hos hundar med DCM visar en predominerande dilatation av vänster kammare och förmak eller en dilatation av alla fyra hjärtkamrar (Tidholm & Jonsson, 1999; Wiersma et al., 2007). Det finns två olika histopatologiska former av DCM där de olika formerna framför allt är kopplade till olika hundraser. Hos newfoundlandshund, grand danois och irländska varghundar förekommer främst en form där attenuerade vågiga fibrer i hjärtmuskulaturen ses (Tilley & Liu, 1975; Sandusky et al., 1984; Tidholm, 2000; Dukes-McEwan et al. 2003). Hos boxer och dobermann förekommer oftast en variant av DCM med fettinfiltration och även fibros i hjärtvävnaden (Hazlett et al., 1983; Everett et al., 1999; Tidholm, 2000; Dukes-McEwan et al., 2003).

Behandling

Vid veterinärmedicinsk behandling av DCM riktas behandlingsstrategin mot att lindra de kliniska sjukdomstecknen och att förhindra en snabb sjukdomsprogression (Jefferies & Towbin, 2010; Simpson et al., 2015). Rekommendationer för medicinsk behandling av DCM hos hund riktar sig framför allt mot att underlätta blodcirkulationen i kroppen (Dukes-McEwan, 2000; Simpson et al., 2015).

I pre-kliniskt stadium, där patienten inte visar några kliniska sjukdomstecken, finns det stöd att använda pimobendan till hundar av rasen dobermann pinscher och irländsk varghund, vilket förlänger tiden tills hundarna utvecklar hjärtsvikt (Summerfield et al., 2012; Vollmar & Fox, 2016). Värdet av att ge medicinen till andra raser i den pre-kliniska fasen har ännu inte

fastställts (Summerfield et al., 2012). Pimobendan är en positiv inotrop som verkar hjärtstimulerande genom att orsaka kraftigare sammandragningar i hjärtmuskulaturen. Preparatet har även en kärlvidgande effekt (Summerfield et al., 2012). I det kliniska stadiet, när patienten uppvisar tecken på hjärtsvikt; såsom hosta, ökad andningsfrekvens och trötthet med mera, är förstahandsvalet vid behandling att sätta in pimobendan och furosemid (vätskedrivande läkemedel) (Bogarelli et al., 2001; O'Grady & O'Sullivan, 2004; Vollmar & Fox, 2016). Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACE-hämmare) och spironolakton kan också sättas in för att minska aktiviteten av renin-angiotensin II- aldosteron-systemet (RAAS) (Dukes-McEwan, 2000; Bogarelli et al., 2001; Summerfield et al., 2012; Simpson et al., 2015). Olika antiarytmika kan användas till olika arytmier (O'Grady & O'Sullivan, 2004).

Prognos

Prognosen för DCM är generellt dålig. I prekliniskt stadium kan hundarna leva i många år utan några sjukdomstecken (Tidholm, 2000). DCM är dessvärre en progressiv, obotlig och dödlig sjukdom. När tecken på kongestiv hjärtsvikt orsakat av DCM har diagnosticerats är överlevnaden kort och drabbade individer brukar endast överleva ett antal månader efter diagnos (Martin et al., 2009; Wess, 2014). Tiden då hundar befinner sig i den kliniska fasen är oftast kort, men lite längre överlevnadsperioder har nyligen rapporterats in hos vissa raser, då läkemedlet pimobendan sätts in i pre-klinisk fas (Summerfields, 2015; Vollmar & Fox, 2016). Vad som upplevs som kort är olika för olika djurägare och veterinärer.

Avel

På grund av att det inte finns ett botemedel mot DCM görs det försök att med hjälp av avel minska incidensen av sjukdomen hos olika hundraser. För att minska incidensen är det viktigt att inte avla på hundar med diagnosticerad sjukdom samt att inte använda hundar som producerat sjuka hundar vid tidigare parningar. Det görs försök att utveckla och etablera olika avelsprogram hos de värst drabbade hundraserna i Sverige. Hos exempelvis dobermann pinscher finns rekommendationer att utföra screening inför avel med hjärtultraljud och Holterundersökning.

Genetik

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR utvecklades på 80-talet av Kary Mullis och är en metod som amplifierar genetiskt material. Detta sker med hjälp av: 1) primers; som är korta DNA sekvenser som binder in till den delen av det genomiska materialet som ska amplifieras och initierar PCR reaktionen, 2) DNA nukleotid baser (dNTP); är enkla nukleotider (A, T, G, C) som används som byggnadsmaterial för DNA kopiorna, 3) Taq polymeras är det enzym; som adderar de nya baserna i DNA kopian, 4) buffert; som hjälper till att säkerställa rätt förhållande för PCR reaktionen. För att detta ska kunna ske utförs cykliska steg som involverar: 1) denaturering; där det dubbelsträngade DNA:t separeras till enkelsträngat DNA, 2) hybridisering; inbindning av primers till enkelsträngat DNA och 3) elongering; nya DNA kopior syntetiseras. De cykliska stegen utförs mellan 20 -40 gånger, vid varje cykel dubblas mängden amplifierat DNA. Då PCR reaktionen är färdig kan storleken av DNA fragmenten kontrolleras samt

kvantifieras. Metoden används för att kvantifiera nivåskillnader av RNA (Gachon et al., 2004; Brown, 2007; Kozera & Rapacz, 2013).

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Denna PCR metod är en av de känsligaste metoderna för att hitta och kvantifiera mRNA nivåer från prover med små mängder material, och används ofta för att analysera genuttryck på RNA-nivå. Metoden använder sig av ett enzym kallat för omvänt transkriptas som bygger upp DNA från en RNA molekyl. RT-PCR börjar med syntetisering av cDNA från total RNA eller mRNA med hjälp av omvänt transkriptas, vilket sedan används som utgångsmaterial för en ”vanlig” PCR. RT-PCR kan också utföras i 1-steg RT-PCR, där omvänd transkription och PCR sker samtidigt eller i en 2-stegs RT-PCR, där det sker separat (Bustin, 2004).

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

qPCR används för att analysera mängden av mRNA för en specifik gen. Metoden kombinerar både PCR amplifiering och detektion i ett steg, vilket medför att gel elektrofores inte behövs för att hitta produkter. Metoden använder sig av fluorescentfärg som märker PCR-produkterna under termal cykling. Fluorescenssignaleringen mäts sedan under den exponentiella fasen av reaktionen (Bustin et al., 2010).

Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

En ny form av PCR med en hög känslighet och noga prestanda har utvecklats för olika typer av analys av DNA/RNA. Metoden kan utföras med EvaGreen som grundmix; vilket ger en signal genom att binda till dubbelsträngat DNA, eller med en mix anpassad för TaqMan hydrolyseringsprober märkta med FAM eller HEX; vilket rapporterar specifik närvaro av en viss sekvens med DNA. ddPCR är en teknologi, där individuella molekyler som avger signaler räknas med hög precision och linjäritet. Varje droppe som innehåller minst en kopia av DNA/RNA molekyl orsakar en fluorescens signal i jämförelse med de PCR dropparna, där de använda primers inte kunnat amplifiera upp genetiskt material. Metoden har en låg andel av falsk-positiva signaler, vilket gör det möjligt att upptäcka endast några få sökta DNA-sekvenser i provet där den enda felkällan är provets kvalitet. Metoden kräver endast minimal provmängd för att kunna utföra antingen 1) 1-steg RT-ddPCR; som kombinerar både första cDNA syntesen (omvänd transkription) och qPCR i samma körning. Fördelen med denna metod är att endast få signaler behövs för att få en positiv träff. Nackdelar är att den tillåter lite mindre flexibilitet för primerstrategier och är mindre funktionell för multipla assays. Analysen kan fortfarande köras multiplex, men att forskaren eventuellt får använda ett annat upplägg än för qRT-PCR, 2) 2-steg RT-ddPCR; första cDNA syntesen och qPCR utförs i två olika körningar. Metoden bygger på två maskiner, en automatiserad ”droplet generator” och en ”droplet reader”. Det medför att multipla signaler från ett RNA-prov kan mätas av ett specifikt mRNA prov genom att använda olika förhållanden och primingmetoder (Hindson et al., 2011; Bio-Rad, 2012).

Genetisk associationsstudie (GWAS)

Genom en GWAS, som är en genetisk associationsstudie av hela arvsmassan där genetiska markörer spridda över hela arvsmassan undersöks (genotypas), kan olika regioner i arvsmassan som associeras med ökad risk att utveckla sjukdom identifieras (Karlsson et al.,

2007; Friedenberg et al., 2016). GWAS grundar sig i användandet av en panel (array) av ett stort antal olika genetiska markörer som används för att genotypa en population av friska och sjuka individer. Association definieras som statistiskt signifikant skillnad i allelfrekvens hos SNP mellan individer med en viss sjukdom jämfört med friska kontroller. Markörerna som används är SNP. Dessa SNP är oftast bialleliska och en uppsättning av cirka 170 000 SNP som tillsammans täcker hela hundgenomet finns att tillgå för att söka efter genetisk association. Efter att en associerad region har identifierats sekvenseras DNAt i regionen från friska hundar och jämförs med sekvensen hos sjuka hundar. När genvarianter (mutationer) som skiljer sig mellan friska och sjuka hundar identifieras måste de valideras i en större population hundar. De genvarianter som identifieras måste sedan utvärderas för deras potentiella effekt i relevant vävnad. Om ett sådant resultat erhålls kan dessa kandidatgenvarianter definieras som kausativa det vill säga, att de är identiska genom nedärvning (identical-by-descent) inom den population som undersöks (Tengvall, 2015). Det finns strukturella mutationer (förändrad aminosyrasekvenser eller för tidiga stoppkodon) och regulatoriska mutationer som påverkar transkription av gener. De regulatoriska mutationerna är vanliga vid komplexa sjukdomar som till exempel DCM och väsentligen mer komplicerade att etablera funktionella effekter för jämfört med strukturella loss-of-function eller gain-of-function mutationer (Brown, 2007).

En typ av mutation som kan leda till förändrat genuttryck är en så kallad kopietalsvariation (Copy Number Variation, CNV). En tydlig uppreglering fås av nivåerna av mRNA hos individer med fler kopior av den eller de gener som finns inom CNV regionen, till skillnad från individer med normalt kopianantal; det vill säga två kopior hos vildtyp ses. Om det däremot inte finns en skillnad krävs vidare undersökningar med hjälp av funktionella studier, där DNA sekvenser inom den associerade regionen, så kallad "enhancers" och promotorer artificiellt klipps ut och klonas in i eukaryota vektorer som styr uttryck av en markör som till exempel Luciferas som inte uttrycks normalt hos däggdjur. Därigenom kan skillnader i luciferasnivåer mellan DNA sekvenser från frisk jämfört med sjuk användas för att på så sätt se hur transkriptionen påverkas (Brown, 2007). Regulatoriska mutationer i "promotor-" eller "enhancer"-regioner styr när och var en gen uttrycks. Det kan ske genom exempelvis en punktmutation eller genom en omorganisering av olika sekvenser i DNAt som påverkar transkriptionen genom antingen upp- eller nedreglering (Brown, 2007).

Baserat på en GWAS kan regioner identifieras och efter att regionen har sekvenserats och utvärderats för skillnader mellan friska och sjuka individer kan sekvenser hittas som skiljer sig mellan friska och sjuka i detaljnivå. De identifierade skillnaderna måste sedan valideras och funktionellt studeras för effekter på transkription (regulatoriska mutationer) eller effekter på proteinfunktion (strukturella mutationer). Den association som identifierats hos grand danois ligger i en "gene desert", där det förekommer kopietalsvariationer (CNV). Om denna del är i en regulatorisk del i DNAt fås en effekt i genuttrycket (Digillio et al., 2016).

Hos newfoundlandshundarna kunde regioner identifieras i genomet som ligger på gränsen till att ge en signifikant association till DCM. Det kan bero på 1) stratifiering; finns det skillnad i allelfrekvens inom rasen i landet på grund av att det inom avel endast används ett fåtal hundar och i extremfall endast en hanhund, 2) fixerade riskfaktorer; har alla hundar riskfaktorn,

exempelvis någon av de gener som påverkar kroppsstorlek. Att alla hundar är stora är en riskfaktor i sig, 3) penetrans; finns konkordans (vid hög genetisk risk har genvarianten hög penetrans). Får individen riskfaktorn utvecklas sjukdom, 4) miljöfaktorer, 5) genetisk bakgrund, och/eller 6) variation inom rasen. Då DCM är en komplex sjukdom kan flera av dessa effekter föreligga. Det finns många genetiska riskfaktorer och miljöfaktorer som samverkar och i sin tur påverkar penetransen (Rockman et al., 2004).

Next-Generation Sequencing (NGS)

För att kunna underlätta identifiering av sjukdomsorsakande mutationer i genomet har forskare utvecklat en metod som kan sekvensera ett helt genom på en dag; så kallat next-generation sequencing (NGS). I dag används det för bärar-screening, upptäckande av ovanliga sjukdomar, tester för fetal aneuploidies och bedömning av risk för cancer (Muzzey et al., 2015). NGS med Illuminateknik har använts för att resekvensera den associerade "gene desert" hos grand danois och på så sätt konfirmerat en CNV.

Metoden går ut på att genetiskt material, antingen genomiskt DNA, mRNA, totalRNA, miRNA, mtDNA med mera, tas från den eller de individer som ska sekvenseras för att identifiera skillnader mellan en individs genom och ett referensgenom. Skillnaderna kallas för "varianter" det vill säga förändringar i DNA sekvensen. Det kan ske genom SNP och korta insertioner/deletioner ("indels") samt stora deletioner/duplikationer ("kopietals variationer", CNV). Materialet kopieras upp och olika approacher kan användas för att ta reda på vilka nukleotider som bygger upp det genetiska materialet som sekvenseras. Det genetiska materialet märks normalt in (indexeras) för att kunna skilja materialet åt efter sekvensering (Muzzey et al., 2015).

NGS finns i flera system exempelvis 454 Life Sciences och Illumina system, där Illumina systemet idag är det mest använda (Oulas et al., 2015). Illumina systemet bygger på DNA replikation. DNA som har blivit uppdelat i mindre fragment, nukleotider och polymerasenzym används för att bilda en ny komplementär sträng. Dessa delar kombineras sedan med fluorescens-markerade baser, en färg för var bas (A, T, G och C) för att få en sekvensering som sedan kan avläsas (Muzzey et al., 2015).

För att kunna identifiera olika variationer jämförs det sammanhängande genomiska DNA:t med referensgenomet. Mutationer som innebär duplikation eller deletion ger antingen en förlängning eller en minskning i DNA-längden, vilket resulterar i en förändrat genomiskt DNA. Sekvensvariationer i enskilda eller flera positioner kan avläsas när DNA sekvenser erhållna från olika individer jämförs (Muzzey et al., 2015).

NGS kan också användas för sekvensering av mRNA uttryck i en viss vävnad. mRNA omvandlas till cDNA. Därefter utförs sekvenseringen på cDNA, vilket sedan jämförs mot ett referensgenom. Detta medför att olika geners uttryck i vävnaden kan analyseras för eventuell upp- eller nedreglering (Quinn et al., 2015).

Tidigare genetisk forskning utförd hos hundar diagnosticerade med DCM

Vid forskning på hundar med DCM har ett antal mutationer identifierats i flera olika gener som kan predisponera för sjukdom. Mutationerna förekommer i gener som framför allt är involverade i hjärtmyocyternas funktion och struktur (Hershberger et al., 2009).

En studie gjord inom rasen irländsk varghund (Philipp et al., 2012) indikerar en association till ökad risk att utveckla DCM till en så kallad enkel-nukleotid polymorfism (single nucleotide polymorphism, SNP) lokaliserad mellan *MOGAT1* och *ACSL3* generna på kromosom CFA 37. På detta locus regleras två enzymer kopplade till lipidsyntesen. Ytterligare fem SNPar har associerats till sjukdomen (CFA1, 10, 15, 17 och 21). Däremot visar en studie på dobermann pinscher på flera andra SNP kopplade till DCM på kromosom 5 med en riskfaktor mellan 53 Mb och 54 Mb (Mausberg et al, 2011).

Grand danois och newfoundlandshund är två raser som har hög risk för att utveckla DCM. Vid en tidigare utförd GWAS visades att kromosom 19 och 1 vara associerade till ökad risk vid sjukdomsutveckling av DCM hos grand danois (opublicerade resultat). På den associerade regionen på kromosom 19 har repetitiva sekvenser i denna så kallad "gene desert" identifierats mellan de två generna *CFC1B* (uppströms) och *AMER3* (nedströms). På kromosom 1 har en association till en region nära genen *KCNN4* visat sig vara involverad. Däremot hos newfoundlandshundarna har flera kromosomer indikerat att vara kopplade till ökad risk att utveckla DCM. På kromosom 7 finns två gener *LAMA1* och *PTPRM*, på kromosom 30 finns två gener *HMG20A* och *PEAK1* och på kromosom 17 finns en gen *NGF*; som eventuellt är associerad till DCM (opublicerade resultat).

"Housekeeping gener"

"Housekeeping gener", eller även kallat referensgener, används för att normalisera skillnader i genuttryck och är nödvändiga att ha med vid analys av geners uttryck. För att en "housekeeping gen" ska vara tillförlitlig måste den uppnå vissa kriterier, bland annat vara stabilt uttryckt i olika vävnader, men framför allt i den vävnad som undersöks. Expressionsnivåerna måste vara oförändrade och inte påverkas av olika experimentella faktorer (Thellin et al., 1999; Chervoneva et al., 2010; Kozera & Rapacz, 2013). Rekommendationer för "housekeeping gener" i ett experiment är att använda sig av minst två stycken; framför allt för att minska risken för felkällor (Nicot et al., 2005; Kozera & Rapacz, 2013). Det finns många använda "housekeeping gener", men en av de mest använda är glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenas (*GAPDH*) kallas även för den "klassiska referensgenen". *GAPDH* är en bra "housekeeping gen", däremot är det viktigt att den kontrolleras i det experiment den ska användas till, då den kan ha varierande uttryck i olika vävnader i den specifika art som studeras (Kozera & Rapacz, 2013). Andra "housekeeping gener" är β 2-mikroglobulin (*B2M*). Studier gjorda med denna "housekeeping gen" har också visat att den kan variera i uttryck i olika vävnader (Brinkhof et al., 2006; Qiaoling et al., 2014; Klenke et al., 2016). Signal recognition particle 14 kDa (*SRP14*) är en "housekeeping gen" som visats vara stabil i sjuk hjärtvävnad hos människa (Pilbrow et al., 2008).

Kandidatgener av relevans att undersöka hos grand danois diagnosticerade med DCM

Det finns många gener som studerats hos människa vid genetiska analyser för DCM. "Cardiac beta-myosin heavy chain" (*MYH7*) och Troponin T typ 2 (*TNNT2*) är några av de gener som uttrycks i hjärtvävnad och som har dokumenterats hos människa att bidra till uppkomsten av DCM genom missense mutation i proteinstrukturen hos proteiner som bildar sarcomererna (Hershberger et al., 2004; Zhao et al., 2015). I en studie av Zhao et al. (2015) påvisades en mutation i *MYH7*-genen genom ett aminosyreutbyte, vilket i sin tur påverkar de funktionella domänerna i huvudet eller "head-rod" junction hos *MYH7* och i *TNNT2* har en ny kausativ mutation som inte är synonym hittats. Mutationer eller varianter i calstabin (*FKBP1B*) har undersökts på humansidan på grund av dess involvering i Ca^{2+} hjärtsignaler. Olika studier har undersökt calstabins påverkan i uppkomsten av ventrikulär takyarytmi, men det råder delade meningar om resultaten. Calstabin stabiliserar RYR2 kanalkomplex, vilket medför att ingen aktivering av kanalen sker under relaxationsfasen. Det finns hypoteser om att en deletion i calstabin är relaterad till CPVT patogenesen (Wehrens et al., 2003; Lehnart et al., 2004, Thomas et al., 2007; Marjamaa et al., 2009). En studie gjord på grand danois har visat ökat genuttrycksförändring av denna gen hos grand danois (Oyama et al., 2009). Studier gjorda på transgena möss har visat att triadin 1 (*TRDN*) påverkar relaxationen i hjärtat och orsakar hypertrofi vid uppreglering av *TRDN*. Alternativ splicing av mRNA, som transkriberas från triadingenen är här orsak till produktion av ett dysfunktionellt protein. *TRDN* har en viktig roll att förankra calsequestrin till Ca^{2+} -kanaler i hjärtvävnaden (Kirchhefer et al., 2000) *TRDN* har påvisats vara förändrat (minskning) i uttryck hos DCM diagnosticerade grand danois (Oyama et al., 2009). *AMER3* är inte helt undersökt, *AMER1* och *AMER2* är mer undersökta och har snarlikt funktion till *AMER3* som är involverad i Wnt- β -catenin signaleringen som reglerar cellproliferation. En studie visar att *AMER3* ökar uttrycket i signaleringsvägen vid mutationer på β -catenin i cancerceller (Brauburger et al. 2014). Mutationer på β -catenin har vidare visats vara associerad med dilaterad kardiomyopati (Hirschy et al., 2010). Association av promotormetylering av *CFC1B* har visat sig vara involverad i kongenitala hjärtfel (fallots tetrad) (Sheng et al., 2014). Gener som implikerats vid DCM hos hund finns beskrivet under etiologi för DCM i detta arbete.

MATERIAL OCH METODER

Etisk prövning

Projektet har blivit godkänd i en etisk prövning av den etiska kommittén för försöksdjur och har följt lokala och regionala föreskrifter.

Hundar och vävnadsselektion

Hundraser som projektet baserades på var grand danois och newfoundlandshund.

I projektet ingick tio stycken grand danois hundar i varierande ålder mellan 0,83-11,09 år (medelålder: 4,57 år). Fyra hundar (tre hanar och en tik) diagnosticerades med DCM och sex hundar (två hanar och fyra tikar) användes som kontrollgrupp. Grand danois hundarna som ingick i studien hade undersökts av veterinärer på hjärtmottagningen på Universitetsdjursjukhuset vid SLU i Uppsala. Diagnosen DCM hade ställts baserat på karakteristiska fynd som överensstämmer med sjukdomen vid en allmän klinisk undersökning och vid en ekokardiografisk undersökning. Från dessa hjärtan har ett urval av färska vävnadsprover från vänster kammare och papillarmuskel i vänster kammare använts. Vid insamling stoppades vävnaderna ner i 1,5 ml mikrocentrifugeringsrör och blev snap-frozen (d.v.s. frystes omgående i flytande kväve).

Tjugotre vävnadsklossar från newfoundlandshundar diagnosticerade med DCM har använts i projektet av sextiofem newfoundlandshundar som tidigare har ingått i ett äldre projekt "*Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy – epidemiology, histopathology and pathophysiology*" (Tidholm, 2000), där paraffinbäddade klossar från hjärtvävnader har sedan sparats. De klossar som tidigare inte DNA-bearbetats och utvärderats valdes ut för att sedan kunna ingå tillsammans med de prover som redan blivit bearbetade i hopp om att kunna titta på gensekvenser kopplade till DCM. Newfoundlandshundarna hade undersökts av veterinärer på Albanos djursjukhus i Stockholm samt andra djursjukhus i Sverige med kriterier för diagnosticering av DCM. Prover från hjärtan taget från övre och nedre halva av lateralväggen från båda kamrarna, proximala-, mellersta- och distala interventrikulära septum samt papillarmuskel från vänster kammare har använts (Tidholm, 2000).

Molekylärgenetiska metoder

Projektet inkluderade flera olika molekylärgenetiska och molekylärbiologiska metoder; bland annat Polymerase Chain Reaction (PCR) och digital droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR) som är olika tekniker för exponentiell amplifiering av selekterad region i en DNA molekyl (Brown, 2007). Dessa användes som grund för att mäta skillnader i genuttrycksnivåer. Housekeeping gener användes för att normalisera uttrycksnivåer för testgenerna i ddPCR enligt rekommendationer. Generella metodbeskrivningen står i litteraturstudien.

DNA och RNA extraktion

För varje prov har genomiskt DNA isolerats med hjälp av tillgängliga kommersiella kit enligt specificerade protokoll från tillverkaren.

För grand danois hundarna användes Allprep[®]DNA/RNA/miRNA och till newfoundlandshundarna QIAamp[®]DNA FFPE kit, båda två är kit från QiaGen (refnr. 80224/refnr. 56404, Hilden, Tyskland)

DNA och RNA isolering samt kvalitetskontroll

För att isolera DNA från paraffinbäddade vävnadsnitt användes QIAamp[®]DNA FFPE kit manual från QiaGen. Åtta sektioner på tio µm i tjocklek skars upp från varje vävnadskloss, totalt 23 vävnadsklossar direkt ner i 1,5 ml märkta mikrocentrifugeringsrör med hjälp av en mikrotom. Paraffinet avlägsnades genom inkubering av provet i 1 ml xylen och därefter två gånger i 1 ml 96 % etanol. Vävnaden löstes sedan upp och inkuberades i 180 µl ATL buffert och 20 µl proteinas K i 56°C under 1 timme, eller tills hela provet hade löst upp helt. Om provet ej löses upp efter 2 h inkubering vid 56°C adderades 20 µl proteinas K och provet fick stå i rumstemperatur under natten, därefter inkuberades provet återigen i 1 h i 56 °C (Sengüven et al., 2014) följt av i 1 h vid 90 °C. Efter att DNA frigjorts från formalin tvättades provet med 200 µl AL buffert och 200 µl 96 % etanol. Därefter överfördes försiktigt hela lysatet till QIAamp MinElute column för att rena fram DNAt i provet. Först bands provet till kolonnen genom centrifugering. Centrifugering skedde vid 6000 x g (8000 rpm) under 1 min och "flow-through" slängdes (Centrifugeringen upprepades om inte all vätska passerat genom membranet första gången, om fortsatt problem ökades varvtalet till max på 10000 x g och tills provet passerat membranet.). Därefter tvättades proverna i QIAamp MinElute column med AW1 och AW2 buffert. Provet eluerades slutligen i 50 µl ATE buffert. Initial kontroll av koncentrationen gjordes med NanoDrop och proverna förvarades sedan i -80 °C.

RNA proverna från grand danois hundarna hade preparerats innan projektets början med kitet Allprep[®]DNA/RNA/miRNA från QiaGen. I korta drag har protokoll för vävnadsprover som volymmässigt motsvarar 10-30 mg använts. Fördelen med QiaGens kit är att både DNA och totalRNA extraheras från samma vävnad. All vävnad har hanterats på is med sterila instrument och homogeniseringen har skett i kyld cryolys från bertin technologies (Montigny-le-Bretonneux, Frankrike) med lysisbuffer (RLT Plus buffert) från QiaGen Allprep[®]DNA/RNA/miRNA kit och centrifugerades vid 6500 rpm under 20 sekunder x 2 med 10 sekunders vila mellan homogeniseringsstegen innan lysatet laddades på kolonnen. Vissa vävnader krävde omkörning för att homogeniseras helt. *CK14* (refnr. KT03961-1-203.05, Bertin corp, Rockville, MD, USA), precellys 2 ml rör har använts och DNA rören har sparats. Lysatet passerade först igenom AllPrep DNA MINI spin kolonnen för att binda DNA. Denna kolonn fick vänta bearbetning, medan RNA-provet hanterades. "Flow-through" som passerat DNA-kolonnen behandlades med proteinas K och etanol för att bryta ner proteiner och laddades sedan på RNeasy Mini spin kolonn för att isolera RNA och miRNA. Efter delningen av DNA och RNA processades de två proverna separat. Innan proverna stoppades undan för förvaring har koncentrationen kontrollerats via NanoDrop och proverna förvarades sedan i -80°C.

Koncentrationsnivåerna av det genomiskt isolerade DNA från vävnadsklossarna bedömdes utifrån spektrofotometri med Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 8000 spectrophotometer). Proverna värderades därefter att vara acceptabla för vidare analyser om absorptionsratio vid 260 nm och 280 nm låg mellan 1,8 - 2,0. Om värdet under- respektive översteg dessa värden, mättes provet om. Om värdet fortfarande inte befann sig inom referensintervallet uteslöts provet. För att värdera *RIN*-värdet av RNA-proverna har de analyserats i en 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) med RNA ScreenTape.

cDNA syntes

cDNA syntetiserades från total RNA som preparerats (se ovan) för att användas vid fortsatta utvärderingar i ddPCR eftersom RNA inte är lika stabil för att frysas och tinans i flera omgångar. 750 ng total RNA omvandlades till cDNA med hjälp av iScript™ cDNA Synthesis protokoll från Bio-Rad Laboratories (4106228, Hercules, CA, USA) från vänster kammare och vänster papillarmuskel från grand danois hundar. cDNA tillverkades även från sju olika hjärtvävnadsdelar från två grand danois hundar, varav en med diagnosticerad DCM och en frisk kontroll. Metoden ger en bra produkt för en 2-steps RT-qPCR som är anpassad för att skapa produkter på <1kb i längd med hjälp av slumpmässiga hexamer primers. En mastermix blandades för proverna innehållande; 5x iScript Reaction Mix 4µl, iScript Reverse Transcriptase 1 µl, nukleinsyra-fritt vatten användes för att späda RNA template till 15µl av 50 ng/µl med totalkoncentration av RNA på 750 g. Total volym för mastermixen på 20 µl. En kontroll med mastermix och nukleinsyra-fritt vatten gjordes för att kunna utvärdera processen. Reaktionsprotokoll innehöll priming i 5 min vid 25°C, cDNA-syntes från RNA i 20 min vid 46°C, inaktivering av cDNA-syntesen i 1 min vid 95°C och därefter ner på 4°C tills förflyttning av provet till en frysa med temperatur på -21°C.

Amplifiering och verifiering av DNA

För att amplifiera DNA-fragment från newfoundlandshundar med hjälp av PCR användes ett kit från QiaGen vid namn HotStarTaq®Plus (refnr. 203601, Hilden, Tyskland). PCR produkterna separerades därefter med agarosegelelektrofores för verifiering av DNA. För att utesluta kontamination av genomiskt DNA i grand danoisproverna utvärderades vävnader från en DCM diagnosticerad hund och en frisk hund på alla sju tagna vävnadsprover på samma sätt som för newfoundlandsproverna.

Procedur: Master mix blandades innehållande 10x PCR buffer eller Coral 10x PCR buffer, dNTP mix (slut koncentration på 200 µM), forward och reverse primer (slutkoncentration på 0,25 µM för varje primer), DNA polymeras och RNase fritt vatten som sedan fördelades i PCR-rör med en slutvolym på 10 µl. Därefter adderades DNA templatet i varje PCR-rör samt endast RNase fritt vatten i ett rör som kontroll. Proverna fördes sedan över i en PCR-maskin (ProFlex PCR system, Applied biosystems by Life Technologies) med följande schema; initialt aktiveringssteg: 10 min vid 94 °C (Taq DNA polymeras aktiveras). 3-steps cykel (40 cykler): Denaturering 1 min vid 94 °C, anealing 1 min vid 60 °C, extension i 1 min under 72 °C. Avslutande syntessteg i 10 min under 72 °C. Därefter ner på 4 °C tills kvantifiering av

proverna för vidare kvalitetskontroll på agarosgel. Om kvalitetskontrollen kördes dagen efter förvarades proverna i kylen i 8 °C.

Tabell 1. *Primernamn och baspar-amplifiering*

Primer	Forward primer, 5' till 3'	Reverse primer, 5' till 3'	Amplifiering av bp-fragment
ABCA4-1	TGTAACGACGGCCAGTTCGC GGTGATAACTGTTCTT	CAGGAAACAGCTATGAC CTTGTTTCTGCTGCTGAG GTG	200
ABCA4-2	TGTAACGACGGCCAGTTCGC GGTGATAACTGTTCTT	CAGGAAACAGCTATGAC CACATCTGCAAGTGCTGC AAG	660
PRDM5	TGATTGTCAGGAATGTATGAAG AA	CACTTGATCGAGCCTCTT GA	1400

DNA kvaliteten bedömdes med hjälp av agarose gelelektrofores av 50-100 ng DNA med 1 % agarosgel. Gelen blandades med 0,5 g agarose och 45 ml TBE buffer (10X TBE) för en liten gel. Gelelektroforesen kördes sedan i 60 V, 400 mA i 1,5 h (BIO-RAD SUB-Cell®GT/MINI-SUB®Cell GT). Använda primers ses i tabell 1 och PCR konditioner var följande: 10 min i 94 °C, 40 cykler med 1) 1 min 94 °C, 2) 1 min 60 °C, 3) 1 min i 72 °C, därefter 10 min i 72 °C och därefter ner på 4 °C tills förflyttning av provet till en kyl i 8 °C.

ddPCR preparering och avläsning

Preparering av proverna inför ddPCR gjordes efter BIO-RAD QX200™ ddPCR™EvaGreen Supermix manual (#10028376, Hercules, CA, USA) och proceduren för reaktionen har utförts efter QX200 instruktionsmanualer (Bio-Rad, #10031906 och 10031907). I supermixen ingick 10 µl av 2xQX200 ddPCREvaGreen Supermix, 2 µl av forward och reverse primer 1 µM (enligt tabell 2) för en slutlig koncentration på 100 nM, spädd DNA templat (0,5 µl cDNA + 0,5 µl nukleinsyrafritt vatten) och 5 µl nukleinsyrafritt vatten till en total volym på 20 µl. All hantering av materialet hade skett på is. Därefter adderades blandningen till olika brunnar med 20 µl i varje brunn i DG8™ Cartridge för QX200™ Automated Droplet Generator (#186-4101, Hercules, CA, USA). PCR-plattan laminades med folie i BIO-RAD PX1 PCR Plate Sealer (#181-4000, Hercules, CA, USA) och centrifugerades i 1500-2000 g i Sorvall®T6000D centrifug innan placering på kylblock i QX200™ Droplet Generator. I QX200™ Droplet Generatorn genererades små oljedroppar som innehöll ett mindre antal templat av cDNA. Dropparna lyftes sedan över till en ny PCR-platta på kylning i väntan på att hela plattan ska bli klar. Därefter slöts PCR-plattan med nytt folie och PCR-amplifieringen i dropparna kunde påbörjas. PCR-amplifieringen utfördes i BIO-RAD C1000Touch™ Thermal Cycler (#185-1197, Hercules, CA, USA). Protokollet innehöll en cykel av enzymaktivering i 95 °C i 5min, 40 cykler av denaturering i 95 °C under 30 s och hybridisering i specifik temperatur beroende på primer i 1 min. Alla steg ändrades med en rampningshastighet av 2 °C/s. En avslutande cykel på 4°C under 5 min kördes för att stabilisera signalen och följdes av 90 °C i 5 min. Sedan förvarades provet på 4 °C tills förflyttning till BIO-RAD QX200™Droplet Reader (#186-4003, Hercules, CA, USA).

Tabell 2. *Primrar som använts till vävnadsproverna från grand danois hundar*

Primer	Genomnamn	Forward primer, 5'till 3'	Reverse primer, 5'till 3'	T _m (°C)
<i>AMER3</i>	Adenomatous polyposis coli APC membrane recruitment 3	TGGAAGTGAAGAGAGGAA AGAC	CTTGGGTGCTGGGACT AAC	52
<i>B2M</i>	β2-mikroglobulin	TCCTCATCCTCCTCGCT	TTCTCTGCTGGGTGTC G	50
<i>CFC1B</i>	Cryptic family protein 1B	GCACGCTCTGATGAACTAA	TAAGAGCAAGCACGG AAGG	51
<i>CTNNB1</i>	β-catenin	TGGCAGCAACAGTCTTACC	CAACATCTTCTTCCTCG GG	51
<i>FKBP1B</i>	Calstabin	CGGGAGACGGAAGGACAT	GCTCCATACGCCACAT C	50
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyd -3-fosfat dehydrogenas	TCCTGCACCACCAACTGCT T	GTCTTCTGGGTGGCAG TGAT	53
<i>MYH7</i>	Cardiac beta-myosin heavy chain	GACCCAGCGTTCTGTCAA	AGTGCCTCCTTCTCATC CA	51
<i>SRP14</i>	Signal recognition particle 14 kDa	GGTTCTGTAGAGGGCTTTG AG	CGGTGCTGATCTTCTTT TTCC	52
<i>TNNT2</i>	Troponin T typ 2	GGAAGGCGAGGCTAAAGA G	CGGTGGATGTCGTCAA AGT	52
<i>TRDN</i>	Triadin 1	TCAGTTTCTTCCAGTGTGTC T	TGTCCTTGTTGCTTCTG TCC	50

Avläsning skedde i BIO-RAD QX200™ Droplet Reader. För att avläsningen ska kunna ske krävs det att datorn har programmet QuantaSoft. I programmet specificerades vilka prover som använts och vilket protokoll som ska användas vid analysen. I detta fall har ABS (absolute quantification)-protokollet använts för att se nivåer av cDNA. När programmet körs räknar maskinen genom att detektera fluorescensintensiteten, storlek och form av dropparna och avgör sedan hur många som är signal-positiva och signal-negativa i provet. Teoretiskt sett behövs egentligen inte proverna körda i ddPCR normaliseras eftersom den ska vara exakt, dock kan det behövas och instruktioner för detta tillhandahålls från Bio-Rad. På så sätt gick det att utvärdera om det var aktuellt för proverna eller inte. De gener som undersöktes var *CFC1B*, *AMER3*, *B2M*, *SRP14*, *GAPDH*, *TNNT2*, *TRDN* och *MYH7*.

Normalisering av gennuttrycksdata gjordes mot *B2M* och *SRP14*. Normaliseringen utfördes genom att ta medelvärdet för varje analyserat prov delat med medelvärdet för *B2M* respektive *SRP14* för det analyserade provet.

Primerdesign och kontroll

Vid design av primers hämtades mRNA (cDNA/CDS) - sekvenser upp från *Ensamble* (http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Info/Index, 2016-11) och *NCBI* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, 2016-11) databaser från hundgenomet via BLAST sökning i FASTA-format. Därefter överfördes sekvensen till *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, 2016-11). Default-datan i *Primer3Plus* justerades med värdet 3,8 på divalent katjon och dNTP-koncentrationen till 0,8, detta enligt instruktioner och rekommendationer från BIO-RAD i avseende av primerdesign för ddPCR.

För kontroll av primers användes *BeaconDesigner* (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>, 2016-11) där kontroll av eventuella sekundära primerstrukturer ("dimer", "hairpin", "crossdimer") utfördes. För kontroll av sekundära strukturer av ampliconet användes *UNAFold* (<http://eu.idtdna.com/UNAFold>, 2016-11)

Vid designing av primers enligt BIO-RAD Droplet Digital™PCR – applications guide behövs följande kriterier följas för att uppnå bästa resultat. GC-innhållet bör ligga runt 50-60%, T_m mellan 50-65°C, sekundära strukturer bör undvikas, G/C repetitioner bör inte vara längre än 3 baser och ligga nära 3' och att forward och reverse primer inte bildar primer-dimers genom att 3' är komplementär.

Primrarna som designats eller använts i detta arbete är specificerat i tabell 2. Designen för *B2M* är hämtat från en studie av Brinkhof et al. (2006) och *GAPDH* har designats av forskare från SLU i ett annat pågående projekt som lånades ut till detta projekt för utvärdering.

Analys av "housekeeping gener"

För att utvärdera vilka housekeepinggener av de som analyserades, som skulle vara lämpliga att använda i hjärtvävnad har ett allmänt tillgängligt software-program *NormFinder* använts (*NormFinder*, MOMA, Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Denmark). *NormFinder* är ett program där stabiliteten av varje gen räknas separat. Via *NormFinder* har data från ddPCR från grand danoishundarna använts för utvärdering av *GAPDH*, *B2M* och *SRP14*.

Statistisk analys av data på respektive gen

För att få robust utvärdering av rådata, som i detta projekt var litet, och därmed riskerade att inte uppfylla kriterierna för användning av en parametrisk metod, har en icke parametrisk statistisk metod använts. Analys med *Kruskal-Wallis* av rådata från respektive gen har utvärderats i MiniTab 17 (Minitab Inc, 2016). Normaliserade gendata mot *B2M* och *SRP14* har också utvärderas med icke-parametriska metoder. Eftersom resultaten inte var signifikanta hos normaliserade gendata utfördes ingen analys med *Mann-Whitney*.

RESULTAT

Grand danois hundar

Utvärdering av RNA-kvalitet

Utvärdering av RNA-kvaliteten på proverna från de olika vävnadsbitarna från hjärtat på grand danois utvärderades innan PCR med hjälp av TapeStation. Mätning av *RIN*-värde från olika vävnadsprover påbörjades innan projektets start. Resultaten i tabell 3 visar värden mellan 5,6-9,4. Hund 7 och 10 har *RIN*-värden som understiger 8,0.

Tabell 3. *RIN*-värde från vänster kammare och vänster papillarmuskel hos grand danois

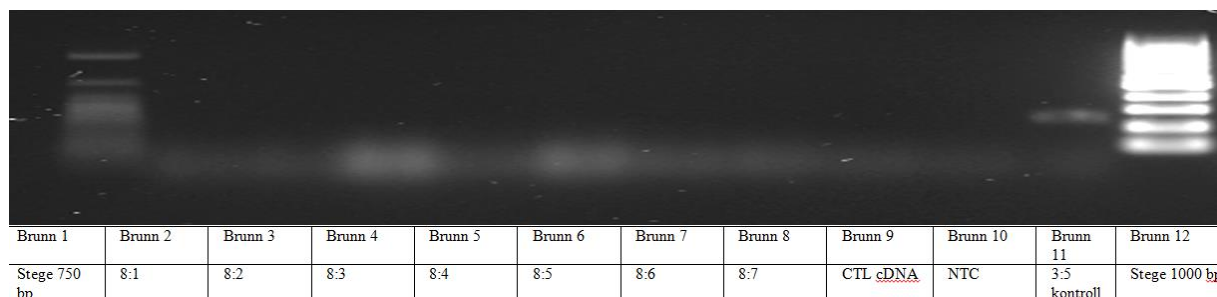
<i>RIN</i> -värde	Hund 1 Frisk kontroll	Hund 2 DCM	Hund 3 Frisk kontroll	Hund 5 Frisk kontroll	Hund 7 Frisk kontroll	Hund 8 DCM	Hund 10 DCM
Vänster kammare	9,2	8,2	8,6	8,7	7,6	8,8	5,6
Vänster papillarmuskel	8,8	9,4	8,2	9	8	9,2	7,7

En frisk kontrollhund (hund 1) och en DCM-diagnosticerad hund (hund 8) valdes ut för utvärdering av alla hjärtvävnadsprover som tagits. Resultaten i tabell 4 visar *RIN*-värde mellan 7,8-9,5. Hund 1 har i vävnad 7 ett *RIN*-värde som understiger 8,0.

Tabell 4. *RIN*-värde från alla hjärtvävnadsprover hos grand danois

<i>RIN</i> - värde	Vävnad 1	Vänster kammare	Vänster papillar- muskel	Vävnad 4	Vävnad 5	Vävnad 6	Vävnad 7
Hund 1 Frisk kontroll	8,4	9,2	8,8	9,5	9,5	8,2	7,8
Hund 8 DCM	8,5	8,8	9,2	8,6	9,3	9,2	8,8

Verifieringen av att det inte fanns genomiskt DNA i vävnadsproverna från grand danois hundarna ses i figur 1. 3:5 i brunn 11 användes som kontroll, då den förväntades ge ett band på ca 200 bp. Använd primer är ABCA4-1 som skapar produkter på ca 200 bp.

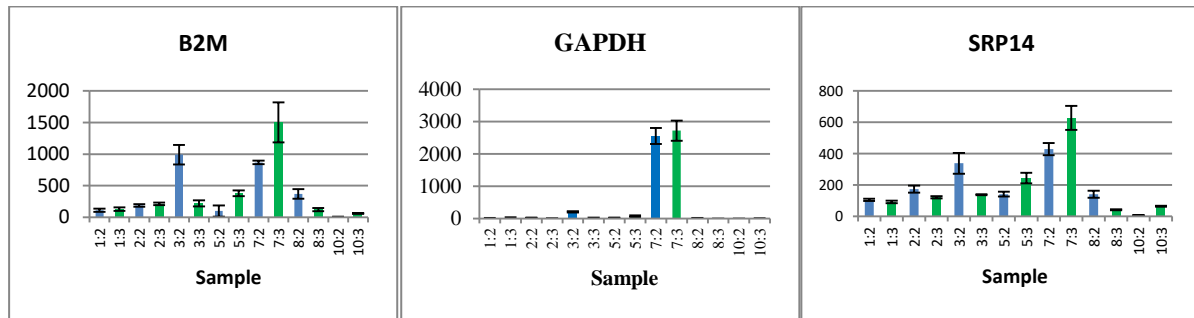


Figur 1. Inga band syntes på gelen som indikerar kontamination av genomiskt DNA

Genuttryck med hjälp av ddPCR

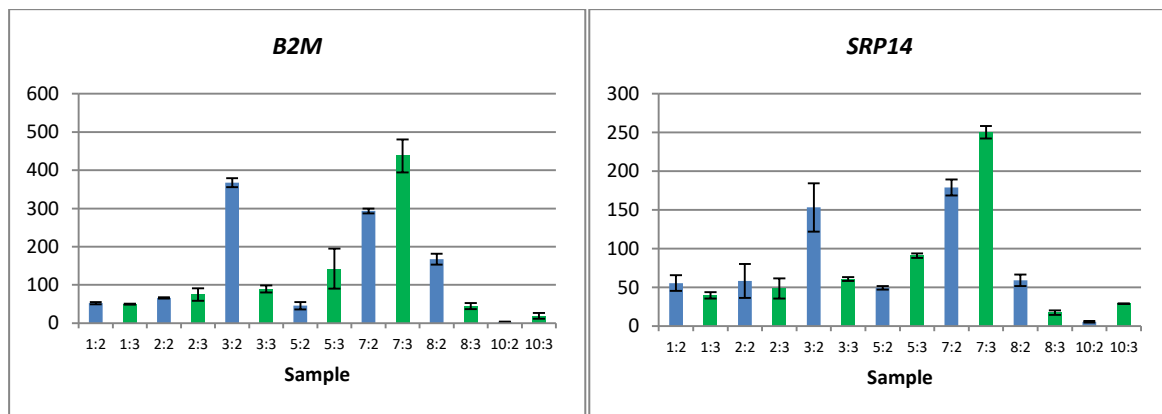
"Housekeeping gener"

Genuttrycket av tre olika "housekeeping gener" *B2M*, *GAPDH* och *SRP14* utfördes i vänster kammare och i vänstra papillarmuskeln hos grand danoishundar. Resultaten i figur 2 visar genernas uttryck för de hundar som ingick i projektet.



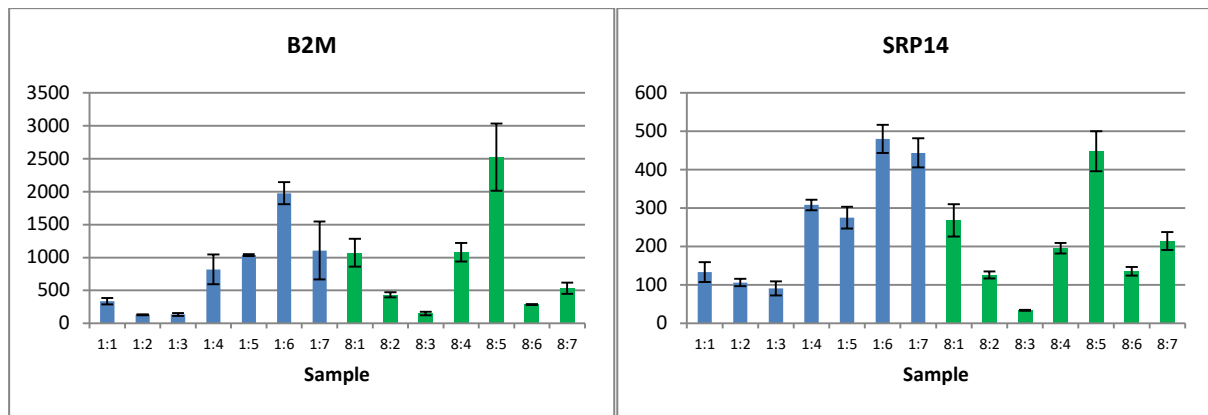
Figur 2. Medelvärde och standardavvikelse för *B2M*, *GAPDH* och *SRP14* för DCM (2:2, 2:3, 8:2, 8:3, 10:2 och 10:3) och friska kontrollhundar (1:2, 1:3, 3:2, 3:3, 5:2, 5:3, 7:2, och 7:3) hos grand danois. Blå stapel representerar vävnad från vänster kammare och grön stapel representerar vänster papillarmuskel

Efter resultat från NormFinder, som visade att den bästa kombinationen för vävnad 2 och för vävnad 3 var *B2M* och *SRP14*. *GAPDH* föreslogs tillsammans med *SRP14* som "housekeeping gen" efter revidering av rådata (uteslutande av hund 7 och 10 som hade lägst *RIN*-värde, se tabell 3). *GAPDH* uteslöts som "housekeeping gen" vid fortsatt undersökning med minskad mängd cDNA. Figur 3 visar "housekeeping genernas" uttryck i olika nivåer i vänster kammare och i vänstra papillarmuskeln beroende på individ med minskad mängd cDNA för att kunna göra en jämförelse med DCM-relaterade gener med samma mängd cDNA. Hund 3 och 7 visades ligga högre i uttryck jämfört med övriga individer. Statistik analys på rådata med *Kruskal-Wallis* visade på statistiska skillnader i uttryck av *SRP14* (p-värde = 0,028) mellan frisk och sjuk individ, men inte *B2M*.



Figur 3. Medelvärde och standardavvikelse för *B2M* och *SRP14* för DCM (2:2, 2:3, 8:2, 8:3, 10:2 och 10:3) och friska kontrollhundar (1:2, 1:3, 3:2, 3:3, 5:2, 5:3, 7:2, och 7:3) hos grand danois. Blå stapel representerar vävnad från vänster kammare och grön stapel representerar vänster papillarmuskel

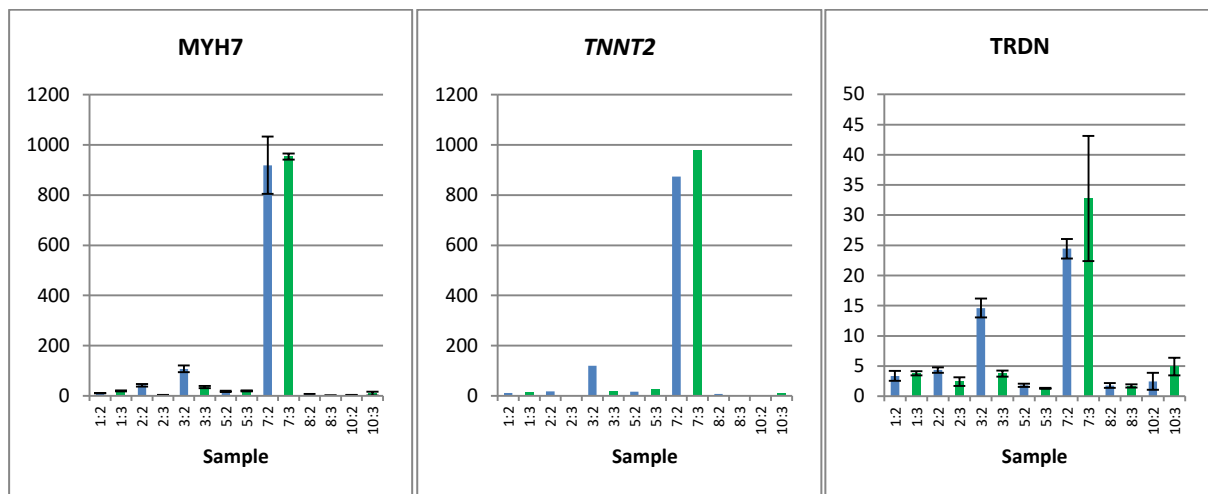
För utvärdering om "housekeeping generna" *B2M* och *SRP14* är stabil i uttryck för både frisk kontroll och för DCM diagnosticerad grand danois i alla hjärtvävnader, visar resultaten i figur 4 på varierande uttryck hos de två hundarna i de olika vävnaderna.



Figur 4. Medelvärde och standardavvikelse för *B2M* och *SRP14* för hund 1 frisk kontroll, blå stapel (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 och 1:7) och för hund 8 DCM, grön stapel (8:1, 8:2, 8:3, 8:4, 8:5, 8:6 och 8:7) hos grand danois för alla hjärtvävnadsprover

Utvärdering av DCM-relaterade gener

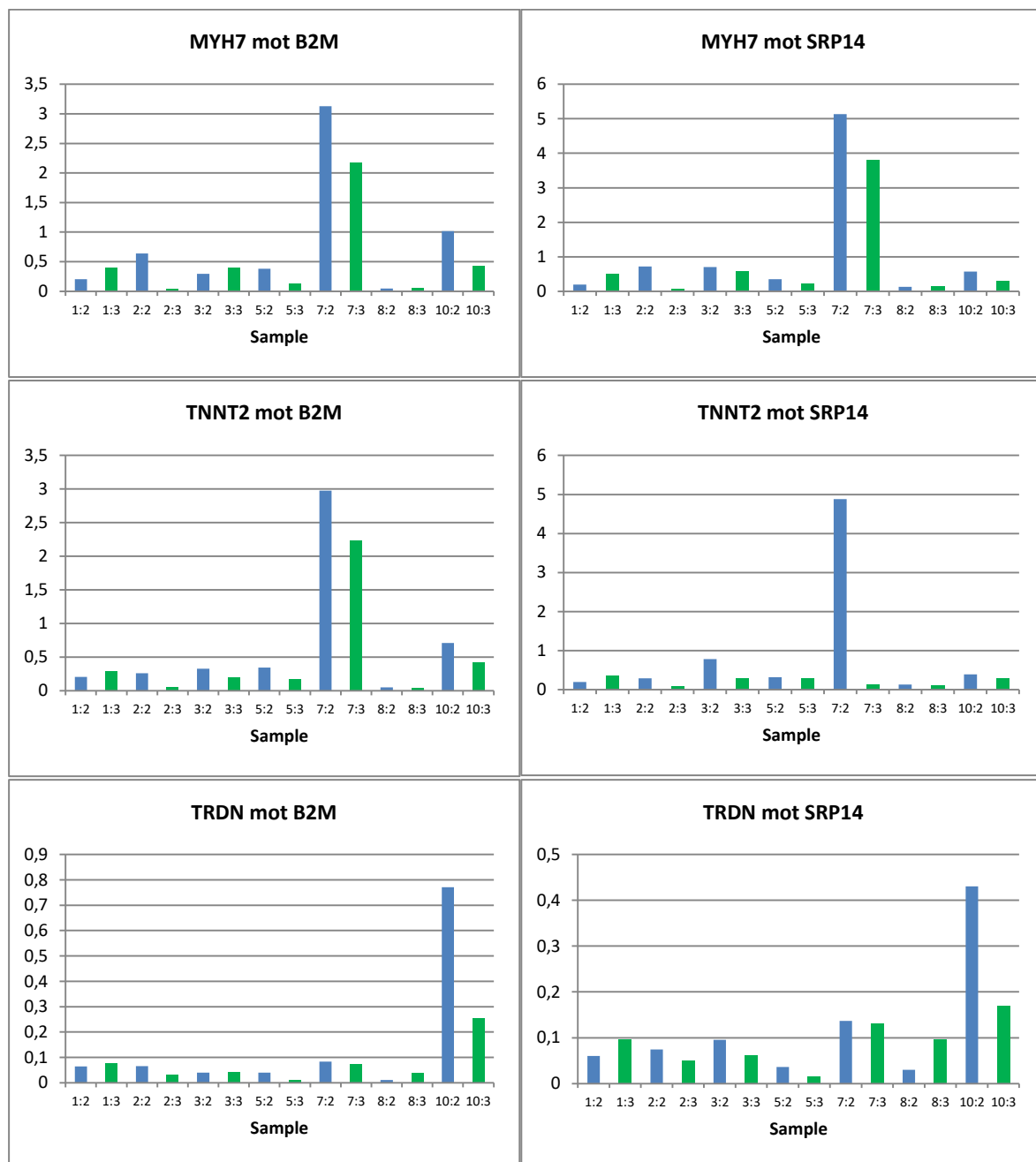
Utvärdering av den icke-normaliserade data (figur 3) visade på signifikanta förändringar i uttrycket av *MYH7* (p-värde = 0,014) och *TNNT2* (p-värde = 0,007), men inte hos *TRDN*. I den icke-normaliserade data kunde det även ses att hund 3 och 7 låg högre i uttryck jämfört med övriga individer.



Figur 5. Medelvärde och standardavvikelse för *MYH7*, *TNNT2* och *TRDN* för DCM (2:2, 2:3, 8:2, 8:3, 10:2 och 10:3) och friska kontrollhundar (1:2, 1:3, 3:2, 3:3, 5:2, 5:3, 7:2, och 7:3) hos grand danois. Blå stapel representerar vävnad från vänster kammare och grön stapel representerar vänster papillarmuskel

Efter normalisering av data mot "housekeeping generna" *B2M* och *SRP14* visades ingen statistisk signifikans hos generna *MYH7*, *TNNT2* och *TRDN* med *Kruskal-Wallis* analysmetod. I figur 4 ses resultaten för *MYH7* och det visas även att hund 7 ligger högre i uttryck jämfört med övriga individer i båda vävnaderna. Resultaten för *TNNT2* visar att även

här ligger hund 7 högre i uttryck jämfört med övriga individer vid normalisering mot *B2M* i båda vävnaderna. Däremot vid normalisering mot *SRP14* endast i vänster kammare. Resultaten för *TRDN* ses även här ses en ökning i uttryck hos hund 7 jämfört med övriga individer vid normalisering mot *B2M*. Däremot vid normalisering mot *SRP14* ses en ökning i uttryck i vänster kammare hos hund 10.



Figur 6. Normaliserade värden för MYH7, TNNT2 och TRDN för DCM (2:2, 2:3, 8:2, 8:3, 10:2 och 10:3) och friska kontrollhundar (1:2, 1:3, 3:2, 3:3, 5:2, 5:3, 7:2, och 7:3) hos grand danois. Blå stapel representerar vävnad från vänster kammare och grön stapel representerar vänster papillarmuskel. Bilderna till vänster visar normaliserade värden mot B2M och bilderna till höger visar normaliserade värden mot SRP14 för respektive kandidatgen

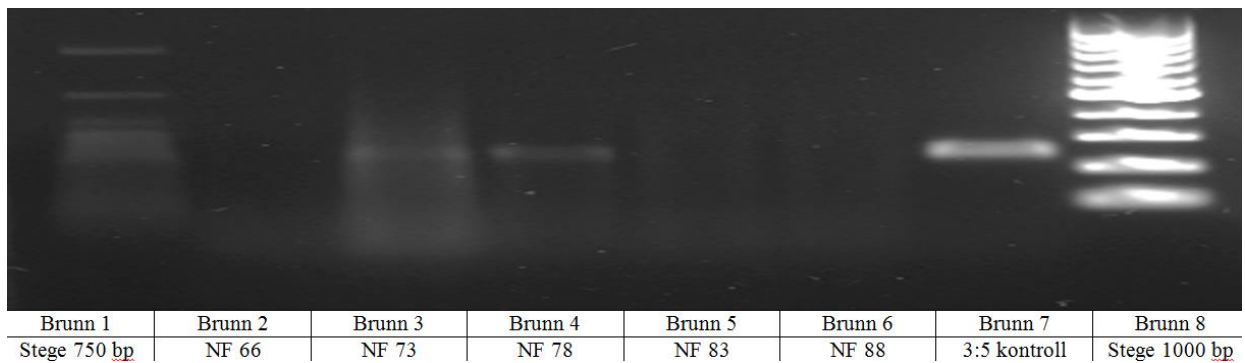
Newfoundlandshundar

DNA-preparation från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE)-vävnad

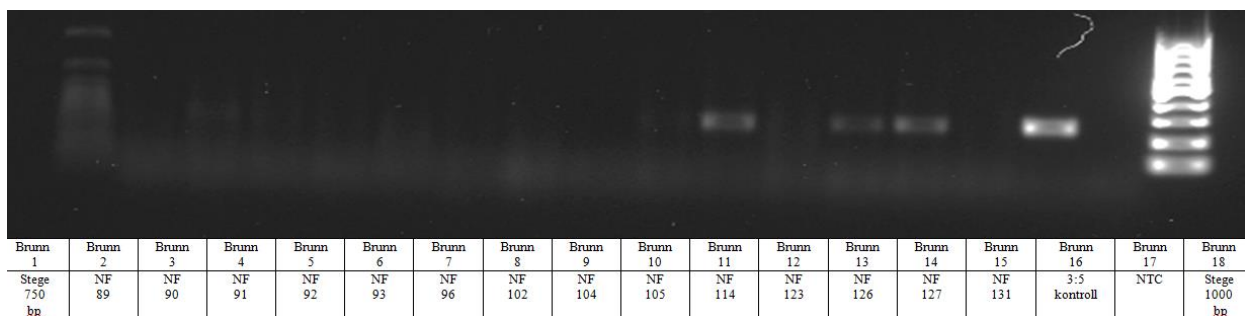
Av tjugotre hundar som DNA preparerades från gamla vävnadsklossar gav fem stycken ett resultat som bör kunna användas för att verifiera geninformation från DNA-fragment motsvarande ca 200 bp. Verifieringen av att det fanns genomiskt DNA i vävnadsproverna från newfoundlandshundarna ses i figur 9 och 10. 3:5 i brunn 7 och 16 användes som kontroll, då den förväntades ge ett band på ca 200 bp. Använd primer är ABCA4-1 som skapar produkter på ca 200 bp. Tabell 4 visar resultat från verifiering från vävnadsproverna hos newfoundlandshundarna. Ytterligare tester av på NF 73, 78, 114, 126 och 127 gjordes med primrar som genererar värden runt 660 bp (se tabell 1), men inga synliga band kunde påvisas på gel.

Tabell 5. *Samlade resultat från extraktion och amplifiering av DNA från vävnadsklossar hos newfoundlandshund*

Newfoundlandshund	Kloss	NanoDrop (DNA ng/μl)	Ratio A_{260}/A_{280} ; A_{260}/A_{230}	Band på gel 200 bp
NF 66	B3832/93	232,6	1,90; 2,21	
NF 73	B1820/00	117,6	1,92; 2,21	X
NF 78	B1079/97	26,15	1,70; 1,63	X
NF 83	B4558/93	123,1	1,85; 2,13	
NF 86	N111/92	28,04	1,89; 1,01	
NF 88	B3800/94	100,3	1,85; 1,59	
NF 89	N15/96	54,66	1,94; 2,10	
NF 90	N5/94	12,61	1,94; 1,86	
NF 91	N191/91	59,68	1,86; 2,29	
NF 92	N144/95	66,0	1,85; 2,12	
NF 93	N26/95	21,88	1,72; 0,23	
NF 94	B2476/95	378,3	1,92; 2,22	
NF 96	N59/62?	112,7	1,93; 1,93	
NF 102	B7743/93	225,0	1,84; 2,18	
NF 104	N39/96	22,89	1,91; 2,20	
NF 105	N60/92	30,91	1,84; 2,02	
NF 109	B3224/98	50,80	1,90; 1,66	
NF 110	B9084/98	27,37	1,85; 1,87	
NF 114	1003-4/01	349,7	1,92; 2,32	x
NF 123	B5250/93	116,5	1,78; 1,52	
NF 126	N243/91	350,0	1,88; 2,09	x
NF 127	N36/92	215,0	1,92; 2,26	x
NF 131	N87/92	218,4	1,78; 1,75	



Figur 7. Synliga band på cirka 200 baspar av genomiskt DNA från NF 73, 78 och 3:5 kontroll

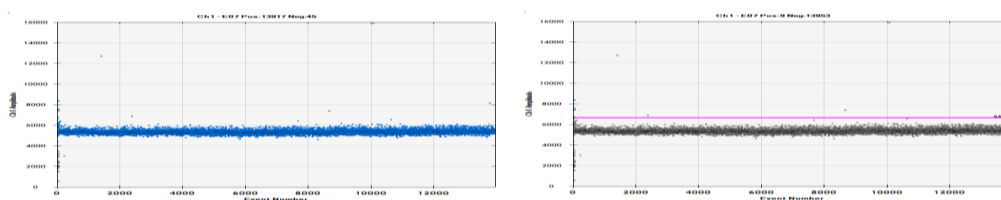


Figur 8. Synliga band på cirka 200 baspar av genomiskt DNA från NF 114, 126, 127 och 3:5 kontroll

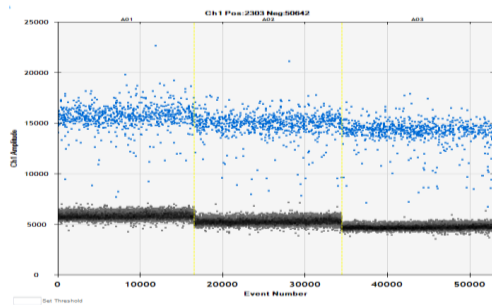
Potentiella problem vid genetiska studier

Felkälla vid avläsning i QuantaSoft

Vid analys av *CFC1B* och *AMER3* blev resultaten "No Call". Ett fåtal prover fick höga värden, dock vid närmre undersökning i QuantaSoft visades resultaten vara felaktiga. Bilden till vänster i figur 4 illustrerar ett av värdena, där programmet QuantaSoft felaktigen tolkat avläsningen som ett resultat, när det egentligen är tal om negativa oljedroppar. På bilden till höger i figur 4 ses en manuell justering av tröskelvärdet, där samma prover från bilden till vänster i figur 4 blivit svart och indikerar negativa oljedroppar, vilket medför att resultatet blir "No Call". Bilden nedan i figur 5 illustrerar ett resultat som har hanterats korrekt av programmet i avseende var tröskelvärdet läggs för negativa- jämfört ned positiva oljedroppar. På grund av "No Call" på *CFC1B* och *AMER3* har inga statistiska analyser kunnat utföras, då det saknas relevans.



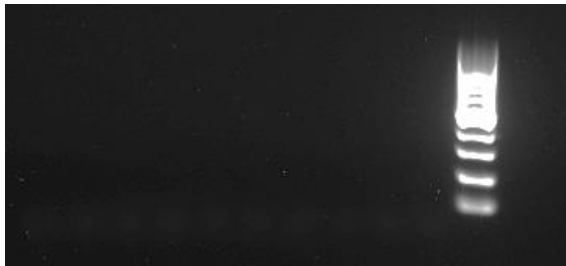
Figur 9. Den vänstra bilden visar ett felaktigt avläst värde från QuantaSoft och den högra bilden visar ett manuellt justerat värde i QuantaSoft



Figur 10. Bilden visar resultat från ett korrekt avläst värde i QuantaSoft

Felkälla vid kontroll av band med HotStarTaq-kit

Verifieringen av att det fanns genomiskt DNA i vävnadsproverna från newfoundlandshundarna kan inte ses i figur 11. En Coral 10x buffert från HotStarTaq[®] Plus PCR kit användes. 3:5 användes som kontroll, då den förväntades ge ett band på ca 200 bp. Även denna kan inte ses i bilden. Endast stegen kan ses på bilden.



Figur 11. Inga synliga band av genomiskt DNA, endast stegen på 1000 bp ses. Här användes Coral 10x buffert i HotStarTaq[®] Plus PCR

DISKUSSION

Ingen tydlig skillnad i genuttryck hos generna *CFC1B*, *AMER3*, *MYH7*, *TNNT2* och *TRDN* kunde identifieras mellan friska kontrollhundar och hundar med DCM inom hundrasen grand danois. Små nivåskillnader kunde påvisas i rådata i RNA som preparerats från hjärtvävnad tagen från sjuka jämfört med friska grand danois hundar med hjälp av ddPCR. Föreliggande uppnådda resultat rörande analysen av genernas uttrycksnivåer i hjärtvävnad hos både friska och sjuka grand danois kan vara behjälpliga vid fortsatta studier inom ramen för projektet. Hos newfoundlandshundar har vävnadsklossar som ingått i tidigare forskning använts för att preparerat nytt DNA gett otillfredsställande resultat. Endast fem av tjugotre prover kunde påvisa synliga band från PCR produkter.

En jämförelse av gendata från denna studie av generna som undersöktes hos grand danois mot tidigare publikation kan inga tydliga fynd påvisas i nuläget hos den svenska grand danois populationen. I tidigare studie har det konstaterats hos grand danois en minskning av genuttryck av *TRDN* (Oyama et al., 2009). I detta projekt kunde tyvärr inte likande nedreglering ses av *TRDN* på grund av för lite rådata vid undersökning. Fler studier krävs innan en riktig slutsats kan dras om nedreglering av *TRDN* kan kopplas till DCM inom den svenska grand danois populationen. Oyama et al. (2009) nämner även en indikation av en uppreglering av *FKBP1B* som medverkar i uppkomsten av DCM. I detta projekt saknas resultat och ingen jämförelse kan dras av denna gen på grund av bristande mängd templat. Oyama et al. (2009) fann även en uppreglering av *MYH7*, även för denna gen kan ingen jämförelse dras på grund av avsaknad av fynd. Övriga gener som undersökts i projektet kan ingen jämförelse dras på grund av att inga resultat inte har publicerats tidigare hos grand danois. Vidare forskning med fler diagnostiserade DCM grand danois krävs för att se om de undersökta generna är en bidragande riskfaktor vid utveckling av DCM.

I dagsläget kan ingen slutsats dras för hur den genetiska bakgrunden hos grand danois. Det krävs vidare forskning av närliggande gener runt "gene-desert" på kromosom 19 och de gener som har visat sig uttryckas eller vara involverade i uppkomst till hjärtsjukdomar hos hundar. Ytterligare undersökningar krävs med högre input-material i ddPCR för att försöka uppnå en säker kvantifiering av differentiellt genuttryck. Om en signifikant skillnad i genuttryck hade hittats i sjuk hjärtvävnad från de kontrollerade generna *MYH7*, *AMER3*, *CFC1B*, *TRDN* och *TNNT2* hade det inneburit en ökad förståelse för hur genuttrycken påverkar hjärtvävnaden vid DCM. Figur 5 visar genuttryck från generna *MYH7*, *TNNT2* och *TRDN* från hundar med DCM och friska kontrollhundar. Hund 7 visar ett större genuttryck övergripande på alla gener. Anledningen till resultatet kan bero på att det blivit för mycket cDNA templat (alltså en högre totalkoncentration) i de proverna genom att spädningen kan ha blivit felaktig. Detta leder till fler kopior vid cDNA amplifiering och är därför inte helt jämförbar med de övriga friska vävnaderna. En annan möjlig teori bakom det högre genuttrycket kan vara att just den individen har ett generellt högre genuttryck.

En statistisk signifikant skillnad för *SRP14*, *MYH7* och *TNNT2* (se figur 3 och 5) kunde påvisas i både vänster kammare och vänster papillarmuskel vid jämförelse mellan friska och sjuka hundar. *SRP14* är en "housekeeping gen" där ingen variation i data eftersträvas, och då det finns en statistisk signifikant skillnad mellan friska och sjuka hundar i rådata indikerar det

en varians. Detta medför att *SRP14* troligen inte är en lämplig "housekeeping gen", men det krävs vidare analysstudier med större mängd input av material för att säkerställa resultatet. En signifikans i uttrycksnivåerna konstaterades även för uttrycket av rådatan för *MYH7* och *TNNT2* vid jämförelse mellan friska och sjuka hundar i vävnad från vänstra papillarmuskeln. För att säkerställa signifikansen för generna utfördes *Mann-Whitney* analysmetod, som resulterade i ingen signifikans för någon av generna.

För att utvärdera om denna signifikans var tillförlitlig, normaliserades rådata mot "housekeeping generna" *B2M* och mot *SRP14*, var för sig. Det resulterade i ingen signifikans för uttrycket hos någon av generna. Detta medförde att *Mann-Whitney* analysmetoden aldrig blev aktuell att använda på normaliserade data från de olika generna. Anledningen till att ingen statistisk signifikans uppnåddes vid utvärdering av de olika generna kan bero på att för få hundar ingick i studien. Om vidare undersökningar utförs i framtiden bör fler hundar inkluderas i studien. Eventuellt kan det resultera i en tydligare trend, som dessutom kan generera en signifikant skillnad i genuttryck mellan frisk och sjuk hjärtvävnad. En annan anledning till resultatet kan vara att *RIN*-värdena på enstaka prover från vissa grand danois hundar var låga (runt 7). Ideala *RIN*-värden ligger >8 (se tabell 3) (Schroeder et al., 2006). Ett lågt *RIN*-värde innebär lägre kvalitet och integritet som bland annat innebär att studera renheten på RNA.

"Housekeeping gener" definieras som gener vars mRNA uttryck inte varierar och studeras eftersom en stabil referens behövs i vävnaden som undersöks och att expressionsnivåerna måste vara oförändrade och inte påverkas av olika experimentella faktorer (Kozera & Rapacz, 2013; Chervoneva et al., 2010; Thellin et al., 1999). Problemet med housekeeping gener är att det sällan finns en eller två gener som passar i alla sammanhang av molekylärgenetisk utvärdering. En gen som passar som "housekeeping" i exempelvis hjärnan, kanske inte alls passar lika bra i levern, vilket kräver utvärdering av ett antal gener för att se om de är lämpliga för den vävnad och prover som ska utvärderas (Nicot et al., 2005; Pilbrow et al., 2008). De "housekeeping gener" som studerades i arbetet är *B2M*, *SRP14* och *GAPDH*. Anledningen till de valda "housekeeping generna" kommer från att *B2M* har tidigare studerats i hjärta hos möss (Qiaoling et al., 2014) och i friska hundhjärtan (Brinkhof et al., 2006). *SRP14* har använts på humansidan i både frisk och sjuk hjärtvävnad (Pilbrow et al., 2008) och *GAPDH* som anses vara en stabil "housekeeping gen" och används ofta inom genetisk utvärdering (Kozera & Rapacz, 2013). mRNA nivåerna har jämförts i vävnader från vänster kammare och vänster papillarmuskel för utvärdering av "housekeeping gener" hos grand danois hundar. Resultaten indikerade att *B2M* och *SRP14* var mest stabil i hjärtvävnad enligt resultat från Normfinder. Uttrycksnivåerna av *GAPDH*s mRNA visade sig dock inte vara stabil vid undersökning med hjärtvävnad hos hund och uteslöts därför som "housekeeping gen" i detta arbete. I NormFinder föreslogs det att *B2M* tillsammans med *SRP14* som bäst alternativ för all rådata i båda vävnader. *GAPDH* föreslogs tillsammans med *SRP14* i båda vävnaderna vid revidering av rådata (uteslutande av hund 7 och 10) som därför uteslöts ur studien.

Hos newfoundlandshund har fokus i detta projekt varit att utvärdera om genomiskt DNA preparerat från paraffininbäddad vävnad på hundar med DCM och friska kontrollhundar håller

tillräcklig bra kvalitet för genetiska studier för validering av tidigare GWAS resultat. Vävsnadsproverna har genomgått histopatologisk analys och är med säkerhet rätt diagnostiserade. Värdering av kvalitén från nypreparerat DNA hos vävnadsklossar från newfoundlandshundar som ingått i tidigare forskning gjordes med PCR analys och via spektrofotometrisk analys och visade otillfredsställande resultat. Vid kontroll av PCR resultaten från genomiskt DNA där PCR reaktionerna separerades på agarosgeler var det endast fem av tjugotre prover där synliga band från PCR produkterna kunde påvisas vid ett test med PCR-primrar som ska generera en produkt på 200 bp (Figur 7 och 8 samt tabell 5). Ytterligare undersökning med primers för ett fragment på 660 bp och 1400 bp gav inga synliga band. I tidigare studier har det band fått och den spektrofotometriska analysen (tabell 5) indikerar på en möjlighet att vidare studera med andra primers för att få upp band på gel. En tolkning av resultatet kan vara att DNA i vävnaden är för degraderat. Degraderingen av vävnaden kan bero på formalinfixering som bildar bindning mellan DNA och protein (Sengüven et al., 2014), ålder på vävnaden och proteiner som inte kunde renas bort vid preparationen av DNA från klossarna. En lösning på problemet skulle kunna vara att förbättra proceduren vid deparaffiniseringen genom att exempelvis hetta upp formalinfixerade prover och därefter behandla med xylol och etanol för att extrahera högre koncentration av rent genomiskt DNA. Ett annat viktigt steg i processen är proteinas K, som används för att bryta ner proteinerna i vävnaden. Detta steg skulle kunna förlängas i upp till 5 dagar tills proteinerna i proverna helt har degraderats för att extrahera högre koncentration av DNA (Sengüven et al., 2014). En annan anledning till att inga synliga band kunde detekteras kan bero på att de primers som använts vid dessa PCR inte binder in tillräckligt stabilt för att sedan kunna amplifiera DNA:t. Flera andra primers kommer att analyseras senare i projektet för att utvärdera denna möjlighet. En tredje orsak kan vara att i just den regionen i DNA:t där primrarna binder in är mer degraderat än andra delar av okänd anledning, vilket kan betyda att ett annat primerpar som ger ett motsvarande fragment i längd kanske skulle kunna fungera för amplifiering av DNA:t. Detta material skulle sedan användas för analys av olika geners effekt i ddPCR om materialet visat sig vara tillfredsställande.

Ett antal felkällor har konstaterats under arbetets gång. Vid avläsning av *CFC1B* och *AMER3* i ddPCR blev resultaten "*no call*" (se figur 9), vilket troligtvis berodde på att för låg mängd cDNA användes vid den analysen. För att bekräfta hypotesen behöver vidare undersökning göras med ökad mängd cDNA, vilket inte kunde göras på grund av brist på reagens från tillverkaren. En annan möjlighet till "*no call*" kan bero på generella problem på de primers som använts vid analysering av generna, exempelvis att de inte varit rätt designade för att passa in på de inbindningsstrukturer de var anpassade för. En annan möjlighet kan vara att GC% var lägre än rekommenderat hos forward primer för *AMER3*, vilket gör primerbindningen mindre stabil på grund av färre vätebindningar som håller ihop strukturen. Det kan då leda till att amplifiering av DNA inte sker eller att amplifieringen gav otillräckliga mängder produkt för att kunna detekteras. En annan teori skulle kunna vara att transkriptionen av dessa två gener är nedreglerade och inte uttrycks hos vuxna hundar i hjärtvävnaden. Det var även meningen att studera generna *CTNNA1* och *FKBP1B*, men detta kunde inte utföras på grund av brist på reagens för vidare ddPCR-analys. En förhoppning hade varit att se en förändring av dessa geners uttryck som sedan kunde kopplas till sjukdomsutveckling av DCM hos grand danois.

Olika justeringar har gjorts för PCR-protokollet för kvalitetskontroll av DNAt från newfoundlandsvävnaden. I QiaGen HotStarTaq Plus DNA Polymerase kit fanns det två olika buffertlösningar (CoralLoadbuffer och PCR buffer) tillgängligt att använda i mastermixen. Skillnaden mellan de två buffertarna är att CoralLoadbuffer är en buffert som kan användas direkt på agarosgel utan tillsättning av gel loading buffert eftersom den innehåller två markörfärger (en orange och en röd) för att påvisa DNAs migration i gelen. Vid amplifiering av DNA med CoralLoadbuffer gavs inga synliga band av genomiskt DNA (se figur 11). Då inga produkter kunde identifieras ens för kontrollprovet misstänktes det som en felkälla i själva metoden. För att säkerställa att metoden fungerade som förväntat med CoralLoadbuffer användes prover från andra projekt där produkter kunnat visualiseras på agarosgel med ett annat kit. Inga synliga band kunde detekteras med CoralLoadbuffer, vilket indikerade felkällan i metoden. Undersökningar gjordes även med utbyte av primrar till amplifiering av DNA, då det fanns en misstanke om att det eventuellt inte band in tillräckligt starkt till DNA för att kunna utföra amplifiering i PCR. Andra teorier som att färgämnet i CoralLoadbuffer inte fungerade testades genom att tillföra extra gel loading buffer innan PCRprodukterna kördes på agarosgelen. Resultaten visade fortfarande inga band på agarosgel. Ytterligare anledningar till att CoralLoadbuffer inte fungerade kan bero på fel pH eller felaktig saltkoncentration. Inga ytterligare undersökningar gjordes för att utreda varför CoralLoadbuffer inte fungerade vid avläsande av gel i BIO-RAD ChemiDoc™ Touch Imaging System. För att utesluta möjliga felkällor byttes bufferten ut till PCR buffer från samma kit, vilket är en alternativ metod till CoralLoadbuffer enligt tillverkaren. Resultaten visade då synliga band på agarosgel (figur 7 och 8).

Vidare genetisk forskning bör göras inom grand danois projektet, framför allt att analysera uttrycksnivåerna av de gener som ligger uppströms och nedströms om ”gene-desert” (*CFC1B* och *AMER3*), men även på fler tänkbara gener som ligger längre ifrån området som skulle kunna påverka hjärtat. Det bör även göras forskning på vilken sorts regulatorisk mutation som kan tänkas ligga i ”gene-desert” och hur det ökade kopietalet påverkar risken att utveckla DCM. Inom ramen för projektet kommer en mRNA sekvenseringsstudie att genomföras vilket förutsättningslöst kommer att kunna identifiera om det föreligger genuttrycksskillnader mellan sjuk och frisk hjärtvävnad.

Ytterligare forskning behövs göras hos newfoundlandshundar för att identifiera genetiska riskfaktorer för DCM som segregerar inom den hundrasen för att utvärdera om det finns någon genetisk association för ökad risk att utveckla DCM. Om den genetiska risken eventuellt är fixerad kan genotyper ses med minskad eller utslagen variation av nukleotider vid en så kallad ”selective sweep”, det vill säga, där alla hundar inom rasen är homozygota jämfört med motsvarande regioner hos hundar som inte drabbas av DCM.

KONKLUSION

Den genetiska studie som förelåg vid projektets start hade identifierat en kopietalsförändring i en region som saknar gener "gene desert" som hypotetiskt skulle kunna påverka genuttrycket. De resultat som erhöles kunde däremot inte påvisa någon förändring i genuttryck hos de undersökta kandidatgenerna *CFC1B*, *AMER3*, *MYH7*, *TNNT2* och *TRDN*. Därför kan i nuläget ingen slutsats dras om "gene-desert" har någon regulatorisk effekt på dessa gener hos sjuka grand danois hundar. "Housekeeping gener" för hjärtvävnad har utvärderats, där *B2M* har visat sig vara relativt stabil i hjärtvävnaden.

Analys av genomiskt DNA från vävnadsklossar från hjärtvävnad tagna från newfoundlandshundar kunde inte prepareras med tillräckligt hög kvalitet för genetiska valideringsstudier av GWAS data. Genomiskt DNA-preparat från tjugotre vävnadsklossar från newfoundlandshundar visade sig vara svårbedömda. I dagsläget har endast fem prover visats ge genomiskt DNA av tillfredsställande kvalitet för analys av olika geners effekt i ddPCR. Fortsatt kvalitetskontroll krävs för att konkludera om materialet kan anses vara tillfredsställande för denna approach. Om detta kan uppnås, kan ytterligare prover från sjuka newfoundlandshundar inkluderas för att eventuellt medföra signifikanta genetiska associationsresultat för den rasen. När detta åstadkommits behövs mer forskning göras hos newfoundlandshundar för att utvärdera om det finns antingen genetisk association alternativt genetisk fixering av de genetiska riskfaktorerna som leder till DCM hos den hundrasen.

REFERENSER

Litteratur och publikationer

- Bio-Rad. QX100 Droplet Digital PCR System Guide. Bio-Rad; Pleasanton, Calif: 2012
- Borgarelli, M., Tarducci, A., Tidholm, A., & Häggström, J. (2001). Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part II: Pathophysiology and therapy. *The Veterinary Journal* , 182-195.
- Borgarelli, M., Santilli, R., Chiavegato, D., & et al. (2006). Prognostic indicators for dogs with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*, 20:104-110.
- Brauburger, K., Akyildiz, S., Ruppert, J. G., Graeb, M., Bernkopf, D. B., Hadjihannas, M. V., et al. (2014). Adenomatous polyposis coli (APC) membrane recruitment 3, a member of the APC membrane recruitment family of APC-binding proteins, is a positive regulator of Wnt- β -catenin signalling. *The FEBS journal*, 281:787-801.
- Brinkhof, B., Spee, B., Rothuizen, J., & Penning, L. (2006). Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem*, 1:356(1):36-43.
- Brown, T. (2007). *Genomes 3*. New York, USA: Garland Science Publishing.
- Brownlie, S., & Cobb, M. (1999). Observations on the development of congestive heart failure in Irish wolfhounds with dilated cardiomyopathy. *J Small Anim Pract.*, 40: 371-377.
- Bustin, S. (2004). *A-Z od Quantitative PCR, IUL Biothechnology Series*. California: International University Line La Jolla.
- Calvert, C. A., Jacobs, G. J., & Pickus, C. W. (1996). Bradycardia-Associated Episodic Weakness, Syncope, and Aborted Sudden Death in Cardiomyopathic Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol.10, pp. 88-93.
- Calvert, C. A., Pickus, C. W., Jacobs, G. J., & Brown, J. (1997). Signalment, survival, and prognostic factors in Doberman pinschers with end-stage cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 11, no. 6, pp. 323-326.
- Calvert, C., & Brown, J. (2004). Influence of antiarrhythmica therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman pinschers with Dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death. *J Am Anim Hosp Assoc*, 40:24-28.
- Chervoneva, I., Schulz, L. Y., Croker, S., Wilson, C., Waldman, S., & Hyslop, T. (2010). Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinforma*, 11:253.
- Cobb, M. (1992). Idiopathic dilated cardiomyopathy: advances in aetiology, pathogenesis and management. *Journal of Small Animal Practis*, 33:113-118.
- Digillio, M. C., & Marino, B. (2016). What Is New in Genetics of Congenital Heart Defects? *Frontier in Pediatrics*, 4:120.
- Distl, O., Vollmar, A. C., Broschk, C., Hamann, H., & Fox, P. R. (2007). Complex segregation analysis of dilated cardiomyopathy (DCM) in Irish wolfhounds. *Journal of Heredity*, vol. 99, no. 4, pp. 460-465.
- Dukes-McEwan, J. (2000). Canine dilated cardiomyopathy 2. Pathophysiology and treatment. *In Practice*, vol.22, no.10, pp.620-628.
- Dukes-McEwan, J., Borgarelli, M., Tidholm, A., Vollmar, A. C., & Häggström, J. (2003). Proposed Guidelines for Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology*, Vol. 5, No.2, pp. 7-19.

- Dyce, K., Sack, W., & Wensing, C. (2010). *Textbook of veterinary anatomy, fourth edition*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., & Häggström, J. (2006). Heart Disease as a Cause of Death in Insured Swedish Dogs Younger Than 10 Years of Age. *J Vet Intern Med*, 20:894-903.
- Everett, R., McGann, J., Wimberly, H., et al., (1999). Dilated cardiomyopathy of Doberman pinschers: retrospective histomorphologic evaluation of heart from 32 cases. *Vet Pathol*, 36:221-227.
- Friedenberg, S. G., Chdid, L., Keene, B., Sherry, B., Motsinger-Reif, A., & Meurs, K. M. (2016). Use of RNA-seq to identify cardiac genes and gene pathways differentially expressed between dogs with and without dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res*, 77:693-699.
- Gachon, C., Mingam, A., & Charrier, B. (2004). Real-Time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot*, 55:1445-1454.
- Hazlett, M. J., Maxie, M. G., Allen, D. G., & et al. (1983). A retrospective study of heart disease in Doberman pinscher dogs. *Can Vet J*, 24:205-210.
- Hershberger, R., Parks, S., Kushner, J., Li, D., Ludwigsen, S., Jakobs, P., et al. (2008). Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Translational Sci.*, 1:21-26.
- Hershberger, R. E., Cowan, J., Morales, A., & Siegfried, J. D. (2009). Progress With genetic Cardiomyopathies: Screening, Counseling and Testing in Dilated, Hypertrophic, and Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.*, 2:253-261.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., & et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem*, 83(22):8604-8610.
- Hirschy, A., Croquelois, A., Perriard, E., Schoennauer, R., Hoerstrup, S., Taketo, M., & et al. (2010). Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic Res Cardiol.*, 105(5):597-608.
- Jarcho, J., McKenna, W., & Pare, J. (1989). Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *New England Journal of Medicine*, 321:1372-1378.
- Jacobs, G. J. (1996). Treating cardiomyopathy in dogs and cats. *Veterinary Medicine*, Juni 1996, 544-563.
- Jefferies, J. L., & Towbin, J. A. (2010). Dilated cardiomyopathy. *The Lancet*, vol.375, no.9716, pp.752-762.
- Karlsson, E., Baranowska, I., Wade, C., Salmon Hillbertz, N., Zody, M., Anderson, N., et al. (2007). Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet*, 39(11):1321-8.
- Kirchhefer, U., Neumann, J., Baba, H. A., Begrow, F., Kobayashi, Y. M., Reinke, U., et al. (2001). Cardiac Hypertrophy and Impaired Relaxation in Transgenic Mice Overexpressing triadin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 4142-4149.
- Klenke, S., Renckhoff, K., Engler, A., Peters, J., & Frey, U. H. (2016). Easy-to-use strategy for reference gene selection in quantitative real-time PCR experiments. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 389:1353-1366.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genetics*, 54:391-406.

- Kvart, C., & Häggström, J. (2002). *Cardiac Auscultation and Phonocardiography in Dogs, Horses and Cats*. Uppsala: TK i Uppsala AB.
- Lehnart, S., Wehrens, X., Laitinen, P., Reiken, S., Deng, S., Cheng, Z., et al. (2004). Sudden death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak. *Circulation*, 109(25):3208-3214.
- Marjamaa, A., Laitinen-Forsblom, P., Lahtinen, A. M., Viitasalo, M., Toivonen, L., Kontula, K., et al. (2009). Search for cardiac calcium cycling gene mutations in familial ventricular arrhythmias resembling catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *BMC Medical Genetics*, 10:12, pp1-9.
- Martin, W. M., Stafford Johnsson, M., & Celona, B. (2009). Canine dilated cardiomyopathy: a retrospective study of signalement, presentation and clinical findings in 369 cases. *J Small Animal Prac. England*, 23-29.
- Mausberg, T.-B., Wess, G., Simak, J., Keller, L., Drögemüller, M., Drögemüller, C., et al. (2011). A Locus on Chromosome 5 Is Associated with Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *PLoS One*, 6(5):e20042.
- McNally, E. M., Golbus, J. R., & Puckelwartz, M. J. (2013). Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no.1, pp.19-26.
- Mestroni, L., Maisch, B., McKenna, W. J., Schwartz, K., Charron, P., Rocco, C., et al. (1999). Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. *European Heart Journal*, 20: 93-102.
- Mestroni, L., Rocco, C., Gregori, D., Sinagra, G., Lenarda, D., & et al. (1999). Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. *J Am Coll Cardiol*, 34: 181-190.
- Meurs, K., Spier, A., Miller, M. W., & et al. (1999). Familial ventricular arrhythmias in boxers. *J Vet Intern Med*, 13:437-439.
- Meurs, K., Miller, M., & Wright, N. (2001). Clinical features of dilated cardiomyopathy in Great Danes and results of a pedigree analysis. *J Am Vet Med Assoc*, 218: 729-732.
- Meurs, K. (2004). Boxer dog cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, sep;34 (5):1235-1244.
- Meurs, K. M., Hendrix, K. P., & Norgard, M. M. (2008). Molecular evaluation of five cardiac genes in Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *AJVR*, Vol 69, No.8, pp.1050-1053.
- Meurs, K. M., Lahmers, B. W., Keene, W., & et al. (2012). A splice site mutation in a gene encoding for PDK4, a mitochondrial protein, is associated with the development of dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *Human Genetics*, vol.131, no.8, pp.1319-1325.
- Meurs, K. M., Stern, J. A., Sisson, D. D., & et al. (2013). Association of dilated cardiomyopathy with the striatin mutation genotype in boxer dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol.27, no.6, pp.1437-1440.
- Morrison, S., Moise, N., Scarlett, J., & et al. (1992). Effect of breed and body weight on echocardiographic values in four breeds of dogs of different somatotype. *Journal of veterinary Internal Medicine*, 6:220-224.
- Muzzey, D., Evans, E. A., & Lieber, C. (2015). Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Genetic Counseling and Clinical Testing*, 158-165.

- Nelson, R. W., & Couto, G. C. (2014). *Small Internal Medicine fifth edition*. Missouri: Elsevier.
- Nicot, N., Hausman, J., Hoffman, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalisation in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*, 56(421):2907-2914.
- O'Grady, M. R., & O'Sullivan, M. L. (2004). Dilated cardiomyopathy: an update. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 1187-1207.
- Olson, T., Michels, V., Thibodeau, S., Tai, Y., & Keating, M. (1998). Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*, Vol.280, pp.750-752.
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., et al. (2015). Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, 75-88.
- Oyama, M. A., Chittur, S. V., & Reynolds, C. A. (2009). Decreased Triadin and Increased Calstabin2 Expression in Great Danes with Dilated Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23:1014–1019.
- Philipp, U., Vollmar, A., & Distl, O. (2007). Evaluation of six candidate genes for dilated cardiomyopathy in Irish wolfhounds. *Animal Genetics*, 39: 84-92.
- Philipp, U., Vollmar, A., Häggström, J., Thomas, A., & Distl, O. (2012). Multiple Loci Are Associated with Dilated Cardiomyopathy in Irish Wolfhounds. *PLoS ONE*, s.1-6, e36691.
- Pilbrow, A., Ellmers, L., Black, M., Moravec, C., Sweet, W., Troughton, R., et al. (2008). Genomic selection of reference genes for real-time PCR in human myocardium. *BMC MED Genomics*, 29:1:64.
- Prosek, R. Dilated Cardiomyopathy. (online) Available from: <http://www.acvim.org/Animal-Owners/Animal-Education/Health-Fact-Sheets/Cardiology/Dilated-Cardiomyopathy>. (Accessed 2016-12-04)
- Qiaoling, L., Tingting, H., Liang, C., Jiayin, S., Jun, X., Rang, L., et al. (2014). Selection of reference genes for normalization of quantitative polymerase chain reaction data in mouse models of heart failure. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 11:393-399.
- Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J. & Henderson, G. (2016). Rang & Dale's Pharmacology. 8th ed. ed: Elsevier
- Rockman, M. V., Hahn, M. W., Soranzo, N., Loisel, D. A., Goldstein, D. B., & Wray, G. A. (2004). Positive Selection on MMP3 Regulation Has Shaped Heart Disease Risk. *Current Biology*, 14:1531-1539.
- Sandusky, G. E., Capen, C. C., & Kerr, K. M. (1984). Histological and ultrastructural evaluation of cardiac lesions in idiopathic cardiomyopathy in dogs. *Can J Comp Med*, 48:81-86.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassman, M., & et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA. *BMC Mol Biol*, 31(7):3.
- Seidman, J., & Seidman, C. (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, 104: 557-567.
- Sengüven, B., Baris, E., Oygur, T., & Berktaş, M. (2014). Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *International Journal of Medical Science*, 11(5):494-499.

- Sheng, W., Qian, Y., Zhang, P., Wu, Y., Wang, H., Ma, X., et al. (2014). Association of promoter methylation statuses of congenital heart defect candidate genes with Tetralogy of Fallot. *Journal of Translational Medicine*, 12:31, pp. 1-9.
- Simpson, S., Edwards, J., Ferguson-Mignan, T. F., Cobb, M., Mongan, N. P., & Rutland, C. S. (2015). Genetics of Human and Canine Dilated Cardiomyopathy. *International Journal of Genomics*, 1-13.
- Sisson, D., Thomas, W., & Keene, B. (2000). Primary myocardial disease in the dog. i S. Ettinger, E. Feldman, & editors, *Textbook of veterinary internal medicine, 5th edition* (ss. 874-895). Philadelphia: WB Saunders.
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O., & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals, second edition*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Sonesson, B., & Sonesson, G. (2006). *Anatomi och fysiologi, fjärde upplagan*. Liber AB.
- Stephenson, H., Fonfara, S., Lopez-Alvarez, J., & et al. (2012). Screening for Dilated Cardiomyopathy in Great Danes in the United Kingdom. *J Vet Intern Med*.
- Summerfield, N. J., Boswood, A., O'Grady, M. R., & et al. (2012). Efficacy of pimobendan in the prevention of congestive heart failure or sudden death in Doberman Pinschers with preclinical dilated cardiomyopathy (the PROTECT Study). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol.26, no.6, pp.1337-1349.
- Summerfield, N. (2015). Recognising pre-clinical DCM; a practical approach. *Boehringer Ingelheim Vetmedica*.
- Tengvall, K. (den 6 October 2015). Genetic Studies in Dogs Implicate Novel Genes Involved in Atopic Dermatitis and IgA Deficiency. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1128*, ss. 1-88.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De, B., Coumans, B., Hennen, G., et al., (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75(2-3):291-295.
- Thomas, N., George, C., Williams, A., & Lai, F. (2007). Ryanodine receptor mutations in arrhythmias: advances in understanding the mechanisms of channel dysfunction. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5):946-951.
- Thornton, B., & Basu, C. (2011). Laboratory Exercise; Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry and Molecular Biology Education Vol. 39, No. 2*, 145-154.
- Tidholm, A., & Jonsson, L. (1996). Dilated cardiomyopathy in the Newfoundland: a study of 37 cases (1983-1994). *Am Anim Hosp Assoc.*, 32:465-471.
- Tidholm, A., Häggström, J., & Jonsson, L. (2000). Detection of attenuated wavy fibers in the myocardium of Newfoundlands without clinical or echocardiographic evidence of heart disease. *American Journal of veterinary research*, 61:238-241.
- Tidholm, A. (2000). *Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy - epidemiology, histology and pathophysiology*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Science.
- Tidholm, A., Häggström, J., Borgarelli, M., & Tarducci, A. (2001). Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part I: Aetiology, Clinical Characteristics, Epidemiology and Pathology. *The Veterinary Journal*, 92-107.

- Tidholm, A. (2006). Survival in dogs with dilated cardiomyopathy and congestive heart failure treated with digoxin, furosemid and propranolol: A retrospective study of 62 dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 41-47.
- Tilley, L., & Liu, S.-K. (1975). Cardiomyopathy in the dog. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 10:641-653.
- Vollmar, A. (2000). The prevalence of cardiomyopathy in the Irish wolfhound: a clinical study of 500 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 36:125-132.
- Vollmar, A. C., & Fox, P. R. (2016). Long-term Outcome of Irish Wolfhound Dogs with Preclinical Cardiomyopathy, Atrial Fibrillation, or Both Treated with Pimobendan, Benazepril Hydrochloride, or Methyldigoxin Monotherapy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 553-559.
- Watkins, H., Ashrafian, H., & Redwood, C. (2011). Inherited Cardiomyopathies. *The New England Journal of Medicine*, 364:1643-1656.
- Wehrens, X., Lehnart, S., Huang, F., Vest, J., Reiken, S., Mohler, P., et al. (2003). FKBP1.2 deficiency and defective calcium release channels (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113(7):829-840.
- Werner, P., Raducha, M. G., Prociuk, U., Sleeper, M. M., Van Winkle, T. J., & Henthorn, P. S. (2008). A novel locus for dilated cardiomyopathy maps to canine chromosome 8. *Genomics* 91, 517-521.
- Wess, G. (2014). Occult Dilated Cardiomyopathy in Dogs: the silent Disease Stage, invisible to the Owner. *Boehringer Ingelheim Vetmedica*.
- Wiersma, A. C., Leegwater, P. A., van Oost, B. A., Ollier, E. W., & Dukes-McEwan, J. (2007). Canine candidate genes for dilated cardiomyopathy: annotation and polymorphic markers for 14 genes. *BioMed Central (BMC) Veterinary Research*, 3:28:pp1-8.
- Wiersma, A. C., Stabej, P., Leegwater, P. A., Van Oost, B. A., Ollier, W. E., & Dukes-McEwan, J. (2008). Evaluation of 15 Candidate Genes for Dilated Cardiomyopathy in the Newfoundland Dog. *Journal of Heredity*, 99(1):73-80.
- Zhao, Y., Feng, Y., Zhang, Y.-M., Ding, X.-X., Song, Y.-Z., Zhang, A.-M., et al. (2015). Targeted next-generation sequencing of candidate genes reveals novel mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Medicine*, 36:1479-1486.

Tack

Ett stort tack till mina handledare; Göran Andersson, Åsa Ohlsson Andersson och Ingrid Ljugvall för all hjälp och uppmuntran under projektets gång. Tack Ingrid för att du har förmedlat ett stort intresse för kardiologi. Göran Andersson och Åsa Ohlsson Andersson, tack för att ni har introducerat mig i ett nytt fält ”genetik” och för många goda och härliga diskussioner.